

346/ 9119 EP

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/02094 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/00 //**
C12Q 1/68, B01J 19/00, G01N 21/64, 33/55

GMBH [DE/DE]; Löbstedter Str. 105, D-07743 Jena (DE).

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/06103

(72) Erfinder; und

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Juni 2000 (30.06.2000)

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EHRICHT, Ralf** [DE/DE]; Rosenstr.8, D-07749 Jena (DE). **ELLINGER, Thomas** [DE/DE]; Ottogerd-Mühlmann-Str. 19, D-07743 Jena (DE). **TUCHSCHERER, Jens** [DE/DE]; Neugasse 13, D-07743 Jena (DE). **ERMANTRAUT, Eugen** [DE/DE]; Mühlenstr. 40, D-07745 Jena (DE). **POSER, Siegfried** [DE/DE]; Schlippenstr. 19, D-07749 Jena (DE). **SCHULZ, Torsten** [DE/DE]; Nollendorfer Str. 11, D-07743 Jena (DE).

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
199 32 423.9 2. Juli 1999 (02.07.1999) DE

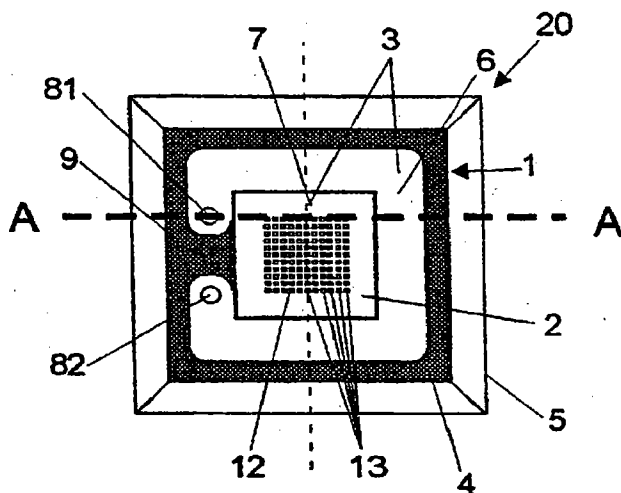
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES**

(74) Anwalt: **PFEIFFER, Rolf-Gerd**; Pfeiffer & Partner, Winzerlaer Str. 10, D-07745 Jena (DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROCHIP MATRIX DEVICE FOR DUPLICATING AND CHARACTERIZING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: MICROCHIP-MATRIX-VORRICHTUNG ZUR VERVIELFÄLTIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN



(57) Abstract: The aim of the invention is to provide a device for duplicating and characterizing nucleic acids almost simultaneously and with a high sample throughput rate, hereby avoiding the disadvantages of the prior art. To this end, the inventive device consists of a chamber body (1) with a recess whose edge sealingly holds an optically transparent chip (2). Said chip holds nucleic acids in individual spots (13) on a detection surface (12). The chamber body (1) is placed on an optically transparent chamber support (5) with a bearing surface (4), in such a way that a capillary gap (7), which can be filled with a liquid sample, is formed between the detection surface (12) of the chip (2) facing towards the chamber support (5) and said chamber support (5). The chamber body (1) is provided with an inlet (81) and an outlet (82), which are spatially separate from each other, and has a space, which laterally encompasses the chip (2) and which has a gas reservoir (6). The chamber support (5) is provided with heating elements.

(57) Zusammenfassung: Die Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren anzugeben, die eine nahezu gleichzeitige Vervielfältigung und Charakterisierung mit einem hohen Probandendurchsatz ermöglicht, und somit die Nachteile des Standes der Technik vermeidet, wird dadurch gelöst, dass die Vorrichtung aus einem Kammerkörper (1), der eine Ausnehmung aufweist, deren Berandung einen optisch transparenten Chip (2), der auf einer Detektionsfläche (12) in einzelnen Spots (13) Nukleinsäuren trägt, dichtend erfasst, wobei der Kammerkörper (1) weiterhin über eine Auflagefläche (4) dichtend auf einem optisch transparenten Kammerträger (5) derart aufgesetzt ist, dass zwischen der dem Kammerträger (5) zugewandten Detektionsfläche (12) des Chips (2) und dem Kammerträger (5) ein mit einer Probenflüssigkeit befüllbarer Kapillarspalt (7) gebildet ist, wobei der Kammerkörper (1) mit einem räumlich voneinander getrennten Einlass (81) und Auslass (82) versehen ist und der Kammerkörper (1) einen den Chip (2) seitlich umfassenden Raum, der ein Gasreservoir (6) umschließt, aufweist und der Kammerträger (5) mit Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung versehen ist, besteht.

WO 01/02094 A1



(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ, EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).

Veröffentlicht:

- Mit internationalem Recherchenbericht.
- Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche geltenden Frist: Veröffentlichung wird wiederholt, falls Änderungen eintreffen.

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

- 1 -

MICROCHIP-MATRIX-VORRICHTUNG ZUR VERVIELFÄLTIGUNG UND CHARACTERISIERUNG VON NUKLEINSÄUREN

Beschreibung

5

Die Erfindung betrifft eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren.

10

Seit Jahrzehnten ist bekannt, daß die Amplifikation (Vervielfältigung) von Desoxyribonukleinsäure (DNS), den Molekülen, die das Genom (die Erbinformation) von Organismen verschlüsseln, in vivo (in der Zelle) durch Transkription erfolgt und in vitro (außerhalb der Zelle) durch die Methode der Polymerasekettenreaktion (PCR) betrieben werden kann.

15

Es ist mittlerweile Labor-Standard, Nukleinsäuren durch die PCR zu vervielfältigen, die PCR-Produkte zu klonieren (in ein Trägermolekül einzubauen und in einen Mikroorganismus einzuführen), die klonierten PCR-Produkte in Mikroorganismen zu amplifizieren und die amplifizierten PCR-Produkte zu isolieren (Sambrook, J; Fritsch, E. F. and Maniatis, T., 1989, Molecular cloning: a laboratory manual 2nd edn.

20

Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory). Diese routinemäßige zweistufige Vervielfältigung ermöglicht, aus einigen wenigen Ausgangsnukleinsäuremolekülen eine enorm große Anzahl gleicher Moleküle zu erzeugen, hat jedoch den Nachteil, daß sie sehr arbeits- und zeitaufwendig ist, einen geringen Probendurchsatz (die Zahl der bearbeiteten Nukleinsäuren in einer Zeiteinheit) aufweist und somit sehr kostenintensiv ist.

25

Die einstufige Vervielfältigung durch PCR hingegen ist verhältnismäßig schnell, ermöglicht durch miniaturisierte Verfahren einen hohen Probendurchsatz in geringen Ansatzvolumina und ist durch Automatisierung nicht so arbeitsintensiv.

30

Eine Charakterisierung von Nukleinsäuren durch eine alleinige Vervielfältigung ist nicht möglich. Vielmehr ist es notwendig, nach der Vervielfältigung Analysemethoden, wie Nukleinsäuresequenzbestimmungen oder elektrophoretische Untersuchungen der PCR-Produkte bzw. deren enzymatisch hergestellten Einzelfragmente, zur Charakterisierung der PCR-Produkte einzusetzen.

35

- 2 -

Aus den Schriften US 5,716,842; DE 195 19 015 A1; WO 94/05414; US 5,587,128; US 5,498,392; WO 91/16966; WO 92/13967; F 90 09894 sowie den Publikationen von S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J. M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert (Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997: 62 672-675) und M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz (Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip, Science, 1998: 280 1046-1048) sind verschiedene miniaturisierbare oder miniaturisierte Verfahren und Geräte (Thermocycler) zur Durchführung der PCR bekannt.

In DE 195 19 015 A1; WO 94/05414; US 5,587,128; US 5,498,392 und der Publikation von S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J. M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert (Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997: 62 672-675) sind Thermocycler beschrieben, die aus gedeckelten Kammern bestehen, welche die Proben aufnehmen.

Die in den Schriften US 5,716,842; DE 195 19 015 A1, WO 91/16966; WO 92/13967; F 90 09894 und der Publikation M. U. Kopp, A. J. de Mello, A. Manz (Chemical amplification: Continuous-flow PCR on a chip, Science, 1998: 280 1046-1048) vorgestellten miniaturisierbaren oder miniaturisierten Thermocycler funktionieren nach dem Prinzip, daß bei ihnen die Probenflüssigkeit kontinuierlich über drei Temperaturzonen gepumpt wird.

Der Nachteil aller o.g. Lösungen ist, daß bei der Online Detektion nur die Information, ob Nukleinsäure amplifiziert wurde und ggf. wieviel Nukleinsäure amplifiziert wurde, erhalten werden kann. Eine weitergehende Charakterisierung der Amplifikationsprodukte ist nicht möglich.

In der US-PS 5,856,174 wird ein System offenbart, mit dem es möglich ist Probenflüssigkeiten zwischen z.B. drei miniaturisierten Kammern hin und her zu pumpen. In einer Kammer dieses Systems erfolgt die PCR, in der nächsten wird eine Aufarbeitungsreaktion durchgeführt und in der dritten werden die Reaktionsprodukte, z.B. mit einem DNS-Chip, detektiert. Bei der PCR-Kammer handelt es sich um ein Standardgefäß, wie es hinlänglich in der Literatur beschrieben ist (S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J.M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert; Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997:

- 3 -

62, 672-67). Der Nachteil dieses Systems besteht darin, daß ein kompliziertes, störanfälliges und steuerungstechnisch aufwendiges System einer druckgetriebenen Fluidik aufgebaut werden muß, um die Probenflüssigkeit von der PCR- in die Detektionskammer zu fördern. Außerdem führt die Trennung von Amplifikation und Detektion zu einer Verlängerung der Gesamtanalysezeit.

Die genetischen Charakterisierungen, bspw. zur Identifikation und taxonomischen Einordnung von Mikroorganismen, erfolgen derzeit anhand von DNA-DNA-Hybridisierungsstudien, rRNA-Gensequenzvergleichen (bspw. mittels der 16S- oder 23S rRNA- Genabschnitte) nach erfolgter Sequenzierung dieser Abschnitte sowie anhand von Restriktionsfragmentlängenpolymorphismusuntersuchungen (RFLP) oder PCR-Untersuchungen mit spezifischen Primern mittels gelelektrophoretischer Trennung und Detektion der Restriktions- oder PCR-Produkte (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Die bekannten RFLP-Untersuchungen basieren auf einer individuen-spezifischen Verteilung von Restriktionsendonuklease-Schnittstellen, die sich auf DNS-Sequenzunterschiede im Bereich genomischer DNS bezieht, welche eine hochgradige Homologie zu einer für die Hybridisierung eingesetzte markierte DNS-Sonde besitzt (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Die RFLP-Untersuchung, die bspw. bei der HLA-Diagnostik (Humanes Leukozyten Antigen) in der Immunologie im Vorfeld von Transplantationen oder Transfusionen Verwendung findet (vgl. Cesbron A., Moreau P., Milpied N., Muller JY., Harousseau JL., Bignon JD., "Influence of HLA-DP mismatches on primary MLR responses in unrelated HLA-A, B, DR, DQ, Dw identical pairs in allogeneic bone marrow transplantation" Bone Marrow Transplant 1990, Nov 6:5, 337-40 oder Martell RW., Oudshoorn M., May RM., du Toit ED., "Restriction fragment length polymorphism of HLA-DRw53 detected in South African blacks and individuals of mixed ancestry" Hum. Immunol. 1989, Dec 26:4, 237-44), umfaßt die Isolierung genomischer DNS, die

Restriktionsendonuklease-Spaltung der DNS, eine Auftrennung der DNS-Fragmente, ein Transfer und eine Immobilisierung der DNS-Fragmente, die Präparation und Markierung der Hybridisierungs-sonden, die Hybridisierung, die Detektion sowie die Korrelation und Interpretation. Der Nachteil dieser bisher nicht automatisierbaren Untersuchung ist, daß eine solche Analyse sehr arbeits- und zeitaufwendig ist (sie umfaßt 5 bis 10 Arbeitstage) und einen geringen Probendurchsatz aufweist (eine Arbeitskraft typisiert lediglich bis zu 50 Proben parallel).so daß sie sehr kostenintensiv ist.

Die Charakterisierung von Genomabschnitten, die anhand von DNS-Molekülen bzw. Ribonukleinsäuremolekülen (RNS-Molekülen) durch Hybridisation mit spezifischen Gensonden erfolgen kann (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford), wird seit mehreren Jahren routinemäßig durchgeführt. Gensonden sind einsträngige Nukleinsäuremoleküle bekannter Nukleotidbasensequenz von optimaler Länge von 100 bis 300 Basen, die spezifisch mit einsträngigen Nukleinsäureabschnitten, bspw. eines Gens, zu einer doppelsträngigen Nukleinsäurepaarung führen und meist mit einem nichtradioaktiven oder radioaktiven Reporterelement (Marker), bspw. einem Fluoreszenzfarbstoff oder Radionukleotiden, versehen sind, welche der Detektion der Gensonden dienen. Man unterscheidet doppelsträngige DNS-Sonden, einzelsträngige RNA-Sonden, maßgeschneiderte synthetische Oligonukleotidsonden mit 10 bis 50 Basen Länge, Genom-Sonden und durch PCR hergestellte DNA-Sonden (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Bei der Hybridisierung unterscheidet man die Hybridisierung von Sonden mit isolierter einsträngiger Nukleinsäure (DNS oder RNS) und die s.g. in situ-Hybridisierung (vor Ort-Hybridisierung in Geweben, Zellen, Zellkernen und Chromosomen), bei der die Gensonde in der Zelle an eine gespreitete (einsträngige) Nukleinsäure (DNS oder RNS) koppelt (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum Akademischer Verlag

Heidelberg, Berlin Oxford). Bei dieser in situ-Hybridisierung ist besonders bedeutsam, daß die Zielsequenz und die Gewebemorphologie erhalten bleibt und daß das konservierte Gewebe für die Sonde und die Nachweisreagenzien permeabel ist. Diese Permeabilität ist nicht immer
5 vorhanden, was einen Nachteil dieser Methode darstellt.

Die Hybridisierung von Sonden mit isolierten und gespreiteten Chromosomen, die ebenfalls als in situ-Hybridisierung bezeichnet wird, umgeht den Nachteil der Permeabilitätsbarriere, da die Chromosomen für die Sonden frei zugänglich, bspw. auf einem Träger fixiert, vorliegen.

10 (T. A. Brown, 1996, Gentechnologie für Einsteiger, Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Essentiell für die Hybridisierung ist das Vorliegen von einzelsträngigen Nukleinsäureziel- und Nukleinsäuresondenmolekülen, was meist durch die Hitzdenaturierung erfolgt, sowie die gewählte optimale Stringenz
15 (Einstellung der Parameter: Temperatur, Ionenstärke, Konzentration helixdestabilisierender Moleküle), die gewährleistet, daß nur Sonden mit nahezu perfekt komplementären (einander entsprechenden) Sequenzen mit der Zielsequenz gepaart bleiben (Leitch, A. R., Schwarzacher, T., Jackson, D. und Leitch I. J., 1994, In situ-Hybridisierung, Spektrum
20 Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin Oxford).

Klassische Anwendungen der Sondentechnik, die die Identifikation von unbekannten Organismen bzw. den Nachweis bestimmter Organismen in einem Organismengemisch ermöglichen, sind beispielsweise phylogenetische Studien oder der Nachweis von Keimen in der
25 medizinischen Diagnostik. In beiden Bereichen basiert der Nachweis der Organismen häufig auf der Analyse der Gene für ribosomale RNS (rRNS, rDNS), welche wegen ihrer ubiquitären Verbreitung und der Existenz von variablen, artspezifischen Sequenzabschnitten für diesen Zweck besonders geeignet sind. Neben diesen Eigenschaften enthält die
30 rDNS flankierende Sequenzabschnitte, die innerhalb des jeweiligen Organismenreiches stark konserviert sind. Gegen diese Abschnitte gerichtete Primersequenzen können zur speziesunabhängigen Amplifikation der rDNS eingesetzt werden (G. Van Camp, S. Chapelle, R. De Wachter; Amplification and Sequencing of Variable Regions in
35 Bacterial 23S Ribosomal RNA Genes with conserved Primer Sequences. Current Microbiology, 1993, 27: 147-151 und W.G. Weisburg, S.M.

- 6 -

Barns, D.A. Pelletier, D.J. Lane; 16S ribosomal DNA Amplification for Phylogenetic studies. J. Bacteriol, 1991, 173: 697-703), wodurch die Sensitivität nachgeschalteter Nachweismethoden erheblich gesteigert wird.

5 In Abhängigkeit von der konkreten Zielstellung stehen verschiedene etablierte Verfahren zur rDNS gestützten Identifikation von Organismen zur Verfügung.

Für die Identifikation unbekannter Organismen wird in der Regel die gesamte (meist 16S) rDNS mit zwei universellen Primern per PCR
10 amplifiziert und anschließend sequenziert. Auf diese Weise sind umfangreiche rDNS-Datenbanken entstanden, die gegenwärtig Sequenzen von mehreren 1000 Organismen enthalten (z.B. RDP /Ribosomal Database Project II, Michigan state University, <http://www.cme.msu.edu/RDP/>) und die phylogenetische Zuordnung
15 neuer Sequenzen erlauben. Dieses Verfahren erlaubt prinzipiell die Detektion jedes beliebigen Organismus, ist jedoch sehr zeitaufwendig und deshalb für diagnostische Anwendungen nicht geeignet. Außerdem ist der Prozeß mit einer Reihe von Fehlerquellen behaftet (F. Wintzingerode, U.B. Göbel, E. Stackebrand; Determination of microbial
20 diversity in environmental samples: pitfalls of PCR-based rRNA analysis. FEMS Microbiology Reviews, 1997, 21: 213-229), wobei insbesondere Rekombinationsprozesse und Punktmutationen während der PCR-Amplifikation zu falschen Ergebnissen führen.

Für diagnostische Anwendungen wurden eine Reihe von alternativen
25 Techniken entwickelt. Mattsson und Johansson (J.G. Mattsson, K.E. Johansson; Oligonucleotide probes complementary to 16S rRNA for rapid detection of mycoplasma contamination in cell cultures. FEMS Microbiol Lett., 1993: 107 139-144) beschreiben ein Verfahren, bei dem ribosomale RNS aus Mycoplasmen isoliert, auf Filtern immobilisiert und
30 durch Hybridisierung von drei unterschiedlichen spezifischen Oligonukleotiden nachgewiesen wird. Dieses Verfahren ist relativ schnell, die Anzahl der zu identifizierenden Organismen und die Sensitivität des Nachweises ist jedoch begrenzt.

McCabe und Mitarbeiter (K.M. McCabe, Y.H. Zhang, B.L. Huang, E.A. Wagar, E. McCabe; Bacterial species identification after DNA
35 amplification with a universal Pprimer pair. Mol. Genet. Metab, 1999;

- 7 -

66: 205-211) beschreiben ein Verfahren, bei dem rDNS aus auf Filterspots lysierten klinischen bakteriellen Isolaten durch Einsatz universeller Primer amplifiziert und anschließend durch Hybridisierung mit spezifischen Sonden identifiziert wird. Dieses Verfahren ist sensitiv; die Zahl der nachzuweisenden Spezies ist jedoch ebenfalls relativ eng begrenzt.

Bei einem von Oyarzabal und Mitarbeitern eingesetzten Verfahren (O.A. Oyarzabal, I.V. Wesley, K.M. Harmon, L. Schroeder-Tucker, J.M. Barbaree, L.H. Lauerman, S. Backert, D.E. Conner; Specific identification of *Campylobacter fetus* by PCR targeting variable regions of the 16S rDNA. Vet Microbiol, 1997, 58: 61-71), bei dem 16S rDNS einer *Campylobacter*-Spezies mittels spezifischer Sonden amplifiziert und die Größe des Produktes bestimmt wird, kann nur eine ja/nein Antwort für einen einzelnen spezifischen Keim generiert werden.

Der Erfindung liegt die Aufgabe zugrunde, eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren anzugeben, die eine nahezu gleichzeitige Vervielfältigung und Charakterisierung mit einem hohen Probendurchsatz ermöglicht, und somit die Nachteile des Standes der Technik umgeht.

Die Aufgabe wird durch die kennzeichnenden Merkmale des ersten Patentanspruchs gelöst. Vorteilhafte Ausgestaltungen sind durch die nachgeordneten Ansprüche erfaßt.

Das Wesen der Erfindung besteht darin, daß durch die Vorrichtung die PCR und die parallele Hybridisierung gegen chipgebundene Nukleinsäure in einer temperatur- und durchflußsteuerbaren Zelle (Kammer) räumlich vereint sind. Dabei trägt die Kammer in ihrem Inneren einen Chip, der zwischen dem Kammerboden und der Detektionsfläche des Chips einen Kapillarspalt generiert, der die Probenflüssigkeit aufnimmt, wobei die Durchmischung der Probenflüssigkeit durch einen induzierten elektroosmotischen Fluß erfolgt.

Vorteilhaft bildet dabei die Kammer um den Kapillarspalt und den Chip ein Gasreservoir, durch das eine Gasreservoirnase zum Kapillarspalt

führt, welche einen Einlaß von einem Auslaß trennt, so daß über den Einlaß die Proben injizierbar sind, auf Grund der Kapillarkräfte von dem Einlaß in den Kapillarspalt gelangen und von diesem über den Auslaß abführbar sind. Beim befüllten Kapillarspalt ist auf Grund von
5 Oberflächenspannungseffekten ein Luftspalt als Ring um den in der Kammer gelagerten Chip und den Kapillarspalt (der als Probenreservoir dient) generiert, so daß der Chip und der Kapillarspalt von dem Kammerkörper thermisch isoliert sind, was dazu führt, daß die Proben im Kammerspalt schnell durch Heiz- und Kühlelemente aufgeheizt und
10 abgekühlt werden können, die gemeinsam mit Temperaturfühlern und Elektroden auf einem Kammerträger, der die Kammer haltet und mit ihr über den Kammerboden in wärmeleitenden kontakt steht, plaziert ist. Dadurch daß der Kapillarspalt als Probenreservoir dient, ist die Verdunstungsrate der Probenflüssigkeit auch bei Temperaturen nahe des
15 Siedepunkts der Probenflüssigkeit stark herabgesetzt, da die Probe nur über den Rand des Kapillarspalts verdunsten kann.

Der Kapillarspalt (das Probenreservoir) ist der Ort der Nukleinsäureamplifikation in der Probenflüssigkeit durch PCR mit
20 spezifischen Primern sowie der genetischen Charakterisierung der Probe. Die markierten PCR-Produkte werden dabei durch die immobilisierten spezifischen Sonden, die auf dem Nukleinsäurechip gebunden sind, aus der Probenflüssigkeit gefischt. Die Kammer und der Chip sind optisch transparent und ermöglichen aufgrund ihrer Ausführung die on line Detektion des Markierungssignals der an die Sonden gebunden PCR-
25 Produkte.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung besitzt gegenüber den bisher verwendeten Verfahren den Vorteil, daß in einer minimalen Diagnosezeit mit minimalen Probenvolumina eine maximale genetische Typisierung unter Verwendung spezifischer Sonden automatisierbar und mit hohem
30 Probendurchsatz in einer temperatur- und durchflußsteuerbaren Zelle möglich ist, wobei durch die PCR ein Hervorheben diagnostisch relevanter Genstrukturen gegenüber einem Sequenzhintergrund und durch die nahezu gleichzeitige, parallele Hybridisierung der PCR-Produkte gegen die chipgebundene Nukleinsäure eine spezifische
35 Detektion bewirkt wird.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung findet z.B. für die gleichzeitige Erkennung von verschiedenen mikrobiellen Krankheitserregern (bspw. auf Basis der 16S oder 23S rRNA-Analyse), das Screening nach Resistenzen einzelner krankheitserregender Mikroorganismen oder eine genomische Typisierung diagnostisch relevanter Allelstrukturen von Eukaryontenzellen Verwendung, wobei die parallele Erkennung durch den Chip mit seinen unterschiedlichen, für die verschiedenen Zielsequenzen spezifischen Sonden ermöglicht wird.

Die Erfindung soll nachstehend anhand der schematischen Zeichnungen und der Anwendungsbeispiele näher erläutert werden. Es zeigen:

Fig. 1: eine prinzipielle Darstellung einer möglichen Ausführungsform einer erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren,

Fig. 2: einen Querschnitt entlang der Ebene A-A gemäß der Fig. 1,

Fig. 3: eine Draufsicht auf die Vorrichtung gemäß der Fig. 1,

Fig. 4: eine schematische Darstellung der Ansicht der Unterseite der Vorrichtung gemäß Fig. 1,

Fig. 5: einen Querschnitt entlang der Ebene B-B gemäß der Fig. 4,

Fig. 6: eine schematische Darstellung der Draufsicht auf den Kammerträger der Vorrichtung gemäß der Fig. 1,

Fig. 7: einen Querschnitt entlang der Ebene C-C gemäß der Fig. 6,

Fig. 8: eine Schematische Darstellung einer möglichen Quadrupolanordnung auf dem Kammerträger der Vorrichtung gemäß der Fig. 1,

Fig. 9: einen Querschnitt entlang der Ebene D-D gemäß der Fig. 8,

Fig. 10a: eine schematische Darstellung einer möglichen Positionierung einer Probenflüssigkeit innerhalb der Vorrichtung gemäß Fig. 1,

Fig. 10b: einen Querschnitt entlang der Ebene E-E gemäß der Fig. 10a,

Fig. 11: eine schematische Blockdarstellung eines möglichen Einbaus der Vorrichtung gemäß Fig. 1 in ein Analysensystem,

Fig. 12a: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 1 in Millimetern,

Fig. 12b: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 2 in Millimetern,

Fig. 12c: eine Angabe der Abmessungen einer Vorrichtung gemäß der Fig. 3 in Millimetern,

5 Fig. 13: eine schematische Darstellung des optischen Strahlengangs durch die Vorrichtung gemäß Fig. 1,

Fig. 14: eine schematische Darstellung einer Ausführungsform eines Chips der Vorrichtung gemäß Fig. 1 und

10 Fig. 15: eine schematische Darstellung sekundärer und tertiärer Amplifikationsprodukte des Chips gemäß Fig. 14.

Die in Fig. 1 gezeigte Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren besteht aus einem Kammerkörper 1 und einem Kammerträger 5. Der Kammerkörper 1 ist mit einer Auflagefläche 4 versehen über die er mit dem Kammerträger 5 dichtend in Verbindung steht, so daß eine Probenkammer 3 ausgebildet ist. Diese Probenkammer 3 besteht aus einem Gasreservoir 6 sowie einem Kapillarspalt 7 und ist mit zumindest einem Einlaß 81 und zumindest einem Auslaß 82 versehen. Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 führen in die Probenkammer 3 und werden von einer zwischengeordneten Gasreservoirnase 9 des Gasreservoirs 6 beabstandet. Der Kammerkörper 1, der bspw. durch eine nicht im einzelnen dargestellte Verklebung oder Verschweißung mit einem Kammerträger 5 unlösbar in dichtender Verbindung steht, haltet einen Chip 2, bspw. einen Nukleinsäure-Chip. Dieser Chip 2, der Detektionsflächen 12 in Form von Spots 13 trägt, ist in dem Kammerkörper 1 derart gehalten, daß die Detektionsflächen 12 in Form der Spots 13 der Oberfläche des Kammerträgers 5 zugewandt gegenüber und durch die Berandung 42 des Kammerkörpers 1 von dem Kammerträgers 5 gleichmäßig beabstandet positioniert sind, so daß der Chip 2 und der Kammerträger 5, wie in Fig. 2 gezeigt den Kapillarspalt 7, der als Probenreservoir dient, generieren. Dieser Kapillarspalt 7 nimmt die Probenflüssigkeit 19 auf. Der Kammerkörper 1 besteht bspw. aus optisch transparenten Kunststoff oder Glas, wobei die Probenkammer 3, die einen Raum zum Einfüllen der Probenflüssigkeit 19 darstellt, durch Fräßen und der Einlaß 81 sowie der

15
20
25
30
35

- 11 -

Auslaß 82, die Leitwege für die Probenflüssigkeit darstellen, durch Bohren in den Kammerkörper 1 eingebracht werden können.

Der Nukleinsäure-Chip 2 besteht bekannter Maßen aus einem optisch transparenten Träger, dessen Material bspw. Silizium oder Glas sein kann, und aus auf diesem Träger immobilisierten Nukleinsäuremolekülen spezifischer Sequenz (z.B. Sonden).

Die Probenkammer 3 umfaßt das Gasreservoir 6 und den Kapillarspalt 7, wobei sich in dem Gasreservoir 6 beim Einfüllen der Probenflüssigkeit 19 auf Grund von Oberflächenspannungseffekten Gas und Luftblasen sammeln, so daß der Chip 2 und der Kapillarspalt 7 vom Kammerkörper 1 thermisch isoliert werden. Der Kapillarspalt 7, der das Probenreservoir (bspw. mit einem Volumen von 1,8 µl) ausbildet, gewährleistet, daß die Detektionsfläche 12 vollständig mit der Probenflüssigkeit 19 benetzt wird.

Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 dienen der Leitung der Probenflüssigkeit 19, wodurch ein Befüllen und Entleeren der Probenkammer 3, und somit infolge der wirkenden Kapillarkräfte auch ein Befüllen und Entleeren des Kapillarspalts 7, ermöglicht ist.

Der Einlaß 81 und der Auslaß 82, die bspw. wie in Fig. 1 gezeigt nebeneinander verlaufen können, sind durch eine Gasreservoirnase 9 voneinander räumlich getrennt, so daß verhindert wird, daß die Probenflüssigkeit 19 vom Einlaß 81 zum Auslaß 82 fließt, ohne in den Kapillarspalt 7 zu gelangen.

Der Kammerträger 5, der optisch transparent und gut wärmeleitend ist besteht bspw. aus Glas, und ist, wie in den Fig. 4, 6 und 8 gezeigt, mit Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17, bspw. in Form miniaturisierter Heizer, und mit miniaturisierten Temperaturfühlern 16 sowie Elektroden eines Quadropol 18 versehen, so daß ein Temperieren der Probenflüssigkeit 19 sowie ein Durchmischung der Probenflüssigkeit 19 durch einen induzierten elektroosmotischen Fluß ermöglicht ist. Bei einer anderen, nicht im einzelnen dargestellten Ausführungsform der Vorrichtung 20 kann der Kammerkörper 1 mit den Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17 und den miniaturisierten Temperaturfühlern 16 sowie den Elektroden des Quadropol 18 versehen sein.

- 12 -

Die Temperaturfühler 16 können bspw. als Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandstemperaturfühler ausgeführt sein. Die Länge der Temperaturfühler 16 beträgt bspw. in dem Fall, daß der Kammerträger 1 eine Fläche von 8 x 8 mm aufweist und der Chip 2 eine Fläche von 3 x 3 mm oder kleiner besitzt, 10,4 mm und die Breite der Temperaturfühler 16 beträgt in diesem Beispiel 50 µm, so daß der Widerstand bei 20°C 4 kOhm und der Temperaturkoeffizient TK_R bei 0°C 1500 ppm beträgt. Alternativ dazu können die Temperaturfühler 16 auch als optisch transparente Dünnschichten ausgeführt sein.

Die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 können bspw. als Nickel-Chrom-Dickfilm-Widerstandsheizter ausgeführt sein. Bei den Dimensionen des vorangegangenen Beispiels haben die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 eine Länge von 2,6 mm und eine Breite von acht Einzelbahnen zu je 50 µm Breite, so daß der Widerstand bei 20°C 300 Ohm beträgt. Alternativ dazu können die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 auch als optisch transparente Dünnschichten ausgeführt sein.

Der Quadrupol 18 kann bspw. als Gold-Titan-Elektroden ausgeführt sein. Bei den Dimensionen des vorangegangenen Beispiels haben diese Elektroden eine Länge von 2,2 mm und eine Breite von 0,5 mm. Der Quadrupol dient der Induktion eines elektroosmotischen Flusses, was zum Durchmischen der Probenflüssigkeit 19 in der Probenkammer 1 führt. Alternativ dazu kann der Quadrupol 18 auch als optisch transparente Dünnschicht ausgeführt sein.

Die Fig. 2 zeigt den Kammerkörper 1, der über die Auflagefläche 4 mit dem Kammerträger 5 in starrer, unlösbarer Verbindung steht. Diese Verbindung kann bspw. durch Verkleben hergestellt sein. Alternativ dazu besteht bspw. auch die Möglichkeit, daß der Kammerträger 5 und der Kammerkörper 1 durch Verschmelzen miteinander verbunden bzw. einstückig gefertigt sind. Zwischen dem Kammerträger 5 und den durch den Kammerkörper 1 über dessen Berandung 42 gehaltenen Chip 2 befindet sich der Kapillarspalt 7 (der als Probenreservoir dient), der auf Grund seiner Kapillarwirkung befähigt ist, Probenflüssigkeit aus der Probenkammer 3 aufzunehmen.

- 13 -

Durch den Kammerkörper 1 führen der Einlaß 81 und der Auslaß 82 in das Gasreservoir 6 der Probenkammer 3, so daß durch den Einlaß 81 Probenflüssigkeit 19 über das Gasreservoir 6 in den Kapillarspalt 7 einfüllbar und über den Auslaß 82 abführbar ist. Der Chip 2 besteht wie
5 der Kammerträger 1 aus optisch transparenten bzw. durchsichtigem Material, wie z.B. Glas, so daß über eine konische Öffnung im Kammerkörper 1, der Ausnehmung 11, optische und photometrische Auswertungen, wie bspw. Fluoreszenzmessungen, von der Detektionsfläche 12 möglich sind.

Die Fig. 3 zeigt den Einlaß 81 und den Auslaß 82 sowie die Ausnehmung 11, durch die die Detektionsfläche 12 mit Spots 13 des Chips 2 optisch zugänglich sind. Diese optische Zugänglichkeit ermöglicht die o.g. optische und photometrische Auswertungen der
15 Signale, die von der Detektionsfläche 12 ausgehen, im Beispiel die nicht dargestellten Fluoreszenzsignale.

In der Fig. 4 sind die auf der Unterseite des transparenten Kammerträgers 5 befindlichen Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17
20 inklusive Leiterbahnen 1517 und Anschlußflächen 1417 gezeigt. Die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 bestehen im Beispiel aus acht einzelnen parallel geschalteten mikrostrukturierten Widerstandsheizleitungen 171, durch die der unter dem Kammerkörper 1 befindliche Kammerträger 5 und mit ihm die eingefüllte
25 Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 homogen beheizbar ist. Die Widerstandsleitungen 171 der Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17, die mit einer unterschiedlichen, definiert vorgebbaren Temperatur beaufschlagbar sind, besitzen solche Dimensionen, daß die o.g. optische Zugänglichkeit der Detektionsflächen 12 des Chips 2 gewährleistet ist.

Die Fig. 5 zeigt die Positionierung der Mittel zur Temperaturbeaufschlagung 17 an der dem Kammerkörper 1 abgewandten Seite des Kammerträgers 5, welcher den Kammerkörper 1 mit dem gehaltenen Chip 2 trägt.

- 14 -

In der Fig. 6 ist ein auf der Oberseite des transparenten Kammerträgers 5 gelagerter Temperaturfühler 16 inklusive Leiterbahnen 1516 und Anschlußflächen 1416 dargestellt. Der Temperaturfühler 16 ist dabei um die Detektionsfläche 12 des Chips 2 gelagert, so daß die genannte optische Zugänglichkeit der Detektionsfläche 12 gewährleistet ist. Der Temperaturfühler 16 sind durch eine in der Abbildung nicht dargestellten Passivierungsschicht elektrisch gegenüber nachfolgenden Elementen der Vorrichtung 20 und gegenüber der Probenflüssigkeit 19 elektrisch isoliert.

Fig. 7 zeigt die Positionierung des Temperaturfühlers 16 an der dem Kammerkörper 1 zugewandten Oberflächenseite des Kammerträgers 5, welche gleichzeitig die Oberflächenseite des Kammerträgers 5 ist, mit der der durch den Kammerkörper 1 gehaltene Chip 2 den Kapillarspalt 7 generiert.

Die Fig. 8 zeigt einen auf die, nicht im einzelnen dargestellte Passivierungsschicht des Temperaturfühlers 16 aufgetragenen Quadrupol 18 inklusive zugeordneter Leiterbahnen 1518 und Anschlußflächen 1418. Der Quadrupol 18 steht in elektrisch leitendem Kontakt mit der Probenflüssigkeit 19, so daß durch das alternierende Anlegen einer Spannung von +1 V an zwei Elektroden 181 des Quadrupol 18 eine durch den elektroosmotischen Fluß induzierbare Verwirbelung in dem mit Probenflüssigkeit 19 befüllten Kapillarspalt 7 hervorgerufen ist. Ist ein anderes Paar Elektroden 181 des Quadrupols 18 unter Spannung gesetzt, so verändern sich die Verwirbelungsbedingungen. Durch ständiges Alternieren der Paare von Elektroden 181, die unter Spannung gesetzt werden, erfolgt eine effektive Vermischung der Probenflüssigkeit 19. Die angelegte Niederspannung von nur einem Volt wird verhindert, daß die Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 elektrochemischen Veränderungen unterliegt und sich bspw. Gasblasen bilden. Der Quadrupol 18 ist dabei, wie in dieser Figur dargestellt, so ausgebildet, daß die optische Zugänglichkeit der Detektionsfläche 12 gewährleistet ist. Alternativ dazu kann der Quadrupol 18 auch als optisch transparente Dünnschicht ausgeführt sein.

- 15 -

Die Fig. 9 zeigt die Positionierung des Quadrupols 18 an der dem Kammerkörper 1 zugewandten Oberflächenseite des Kammerträgers 5.

Die Fig. 10a und b zeigen schematisch die sich durch Kapillarkräfte zwischen Kammerkörper 1 und Kammerträger 5 im Kapillarspalt 7 gelagerte Probenflüssigkeit 19.

Aufgrund der Größe des Gasreservoirs 6 sind, getrieben von der Minimierung der Grenzflächenenergie, etwaige, nicht im einzelnen dargestellte Luftblasen aus dem Kapillarspalt 7 in das Gasreservoir 6 der Probenkammer 3 ableitbar. Dadurch bildet sich um die Probenflüssigkeit 19 ein Lufring, der diese und den Chip 2 von dem Kammerkörper 1 thermisch isoliert, so daß die Probenflüssigkeit 19 im Kapillarspalt 7 bei geringem Energieverbrauch schnell aufgeheizt und abgekühlt werden kann. Gleichzeitig ist dadurch die Verdunstungsrate der Probenflüssigkeit 19 auch bei Temperaturen nahe des Siedepunktes stark herabgesetzt, da die Probenflüssigkeit 19 nur über den Rand des Kapillarspaltes 7 verdunsten kann. Hinzu kommt, daß der Bedarf an Probenflüssigkeit 19 gering ist (im μl -Bereich) Probenreservoir 7, da der Kapillarspalt 7 nur geringes Raumvolumen ausbildet, wodurch die benötigten Probenvolumina sehr klein sind.

Aufgrund der beschriebenen guten thermischen Isolation des Chips 2 und der Probenflüssigkeit 19 gegenüber dem Kammerkörper 1 sowie des geringen Volumens der Probenflüssigkeit 19, lassen sich die für Mikrothermocycler üblichen, von Posner u.a. beschriebenen Heiz- und Kühlraten erreichen (S. Poser, T. Schulz, U. Dillner, V. Baier, J.M. Köhler, D. Schimkat, G. Mayer, A. Siebert; Chip elementes for fast thermocycling, Sensors and Actuators A, 1997, 62: 672-675). Gleichzeitig ist die Temperaturhomogenität der Probenflüssigkeit 19 und der Wärmeeintrag in die Probenflüssigkeit 19, die im Kapillarspalt 7 zwischen dem Chip 2 und dem temperierbaren Kammerträger 5 positioniert ist, aufgrund des großen Heizflächen-zu-Probenvolumenverhältnisses in hohem Maße gewährleistet.

Figur 11 zeigt den Einbau der Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in ein Analysesystem 200. Das Analysesystem 200 besteht dabei aus einem Temperaturregler 21, einer Vermischungssteuerung 22, elektrischen Leitungen 23, 24, 33, 34, einem

- 16 -

Gesamteinlaß 25, einem Abfallgefäß 26, einem Konditionierer 27, Ventilen/Pumpen 28, Vorratsbehältern 29, Verbindungsschläuchen 30, einer Konditionierersteuerung 31, einer Automatensteuerung 32, einem Steuerrechner 35, einem Rechnerbus 36 und einem
5 Pipettierautomaten 37. Die Vorrichtung 20 steht über den Einlaß 81 und den Auslaß 82 unmittelbar mit Konditionierer 27 und dem Abfallgefäß 26 sowie über die elektrischen Leitungen 23 und 24 unmittelbar mit dem Temperaturregler 21 und der Vermischungssteuerung 22 in Verbindung, wobei der Temperaturregler
10 mit den Temperaturfühlern 16 und den Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung 17 und die Vermischungssteuerung mit dem Quatrupol 18 gekoppelt ist.

Bei der in das Analysesystem 200 eingebauten Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren ist die
15 Probenflüssigkeit 19 über den Pipettierautomaten 37 aus nicht im einzelnen dargestellten Mikroplates in den Gesamteinlaß 25 pipettierbar. Durch die Ventile und Pumpen 28, die mit dem Gesamteinlaß 25 in flüssigkeitsleitender Verbindung steht, ist die Probenflüssigkeit 19 durch die Verbindungsschläuche 30 in den Konditionierer 27 leitbar, wobei der
20 Konditionierer 27 zur Aufarbeitung der Probenflüssigkeit 19 dient (bspw. pH-Wert-Einstellung und Ausfiltrieren störender Substanzen). Die Pufferflüssigkeiten und Reaktionslösungen für diese Aufarbeitung sind aus den Vorratsbehältern 29, die mit dem Konditionierer 29 in flüssigkeitsleitender Verbindung stehen, zuführbar. Der
25 Pipettierautomat 37 und der Konditionierer 29 stehen mit der Konditionierersteuerung 31 und der Automatensteuerung 32 über die elektrischen Leitungen 33 in Verbindung und dienen der Kontrolle und Regelung dieser. Der Einlaß 81 und der Auslaß 82 des Kammerkörpers 1, die in das Gasreservoir 6 führen, dienen der
30 Flüssigkeitsleitung von dem Konditionierer 29 über den Kapillarspalt 7 hin zum Abfall 26.

In der Vorrichtung 20 ist die Probenflüssigkeit 19 im Bereich des Kapillarspalts 7 mittels des Temperaturreglers 21 und der Vermischungssteuerung 22 temperierbar und vermischbar. Der
35 Kapillarspalt 7 ist dadurch der Ort der Verstärkung und Charakterisierung einer Nukleinsäure, im Beispiel der Target-DNS.

- 17 -

Die Figuren 12a bis c zeigen am Beispiel einer Ausführungsform der Vorrichtung 20, daß der Kammerkörper 1 eine Länge und Breite von 8 mm sowie Höhe von 3 mm aufweist, das Gasreservoir Länge und Breite von 5,4 mm sowie eine Höhe von 0,5 bis 0,8 mm besitzt, der Kammerträger 5 eine Dicke von 0,9 mm, die Ausnehmung 11 auf ihrer, dem Chip 2 zugewandten Seite einen Durchmesser von 2,8 mm und der Einlaß 81 und der Auslaß 82 einen Durchmesser von 0,5 mm besitzen, wobei der Einlaß 81 und der Auslaß 82, sowie die Ausnehmung 11 gegenüber dem Kammerträger 5 eine Neigung von 70° aufweisen.

In der Abb. 13 ist der optische Strahlengang durch eine weitere Ausführungsform der Vorrichtung 20, bei der die Auflagefläche 4 mit dem Kammerträger 5 über eine zusätzliche Dichtfläche 43 lösbar und dichtend verbunden ist, für die Dunkelfeld Fluoreszenzabbildung der Detektionsfläche 12 Chips 2 gezeigt. Das Anregungslicht wird, wie dargestellt, durch den Dunkelfeldspiegel 38 auf die Detektionsfläche 12 entlang des Anregungslichtstrahlengangs 39 gelenkt. Das Fluoreszenzlicht, das von der Detektionsfläche 12 ausgeht, wird entlang des Detektionslichtstrahlengangs 40 auf ein Mikroskopobjektiv 41 gelenkt. Dabei beträgt im Beispiel der Abstand zwischen dem Dunkelfeldspiegel 38 und der Detektionsfläche 12 ca. 4,6 mm und der Abstand zwischen der Detektionsfläche 12 und dem Mikroskopobjektiv 41 ca. 22,0 mm.

Das optische Auslesen des Wechselwirkungssignals zwischen der in Fig. 14 gezeigten Target-DNS 50 und der Sonden-DNS 56, 57, 58, 59 auf der Oberfläche des Chips 2 kann aufgrund der Konstruktion der Vorrichtung 20 online erfolgen.

Der Chip 2 ist so in dem Kammerkörper 1 gehaltert, daß er in einem weiten Raumwinkel mittels Licht durchstrahlt werden kann, so daß online oder in situ die Hybridisierung mittels der markierten Sonden 56, 57, 58, 59, z.B. Fluoreszenzmessungen, verfolgbar sind. Die Anordnung und Größe des Temperaturfühlers 16 und des Quadrupols 19 ist so gestaltet, daß der Strahlengang für die Online Detektion bzw. die nachfolgende in situ Detektion nicht gestört wird und die Detektion der Wechselwirkungen auf den Spots 13 durch alle Formen der optischen Detektion oder Spektroskopie (z.B. Photometrie, Differential-

photometrie, konfokale Fluoreszenzmessung, Dunkelfeld Fluoreszenzmessung, Durchlicht Fluoreszenzmessung, Auflicht Fluoreszenzmessung usw.) auswertbar sind, wobei die Label 60 und Messmethode aufeinander abgestimmt sein müssen.

- 5 Die Abb. 14 zeigt die schematische Darstellung des Chips 2, der die Primer 54 (A) und 53 (B') trägt, wobei diese den spezifischen Sequenzbereich der Target-DNS 50, also die Sequenzen A,X,S1,X,B und B',X,S1',X,A', entsprechen. Die Sequenzen A und B bzw. A' und B' definieren den für alle Spezies identischen Bereich der Target-DNS 50
- 10 beziehungsweise der einsträngigen AB-Target-DNS 51 und A'B'-Target-DNS 52. Auf dem Chip 2 sind im Beispiel über Spacer 55 Sonden 56, 57, 58 und 59 immobilisiert, die Sequenzen tragen, die spezifisch für die Target-DNS 50 einer bestimmter Herkunft sind, d.h. in dem dargestellten Beispiel hybridisieren nur die Sonden 56 und 57 mit
- 15 den Sequenzen S1 und S1' an die Verstärkungsprodukte der Target-DNS 50 (gezeigt in Fig. 15). An den Sonden 58 und 59 mit den Sequenzen S2 und S2' findet hingegen keine Hybridisierung statt. Die Primer 53 und 54 tragen bspw. eine Fluoreszenzmarkierung 60, die durch den Verstärkungsprozeß in die sekundären Amplifikations-
- 20 produkte 61 und 62 eingebaubar ist, wodurch die Hybridisierung an den Sonden 56 und 57 während der Verstärkung durch Fluoreszenzmessung detektierbar ist, so daß die Entscheidung ermöglicht wird, ob die Target-DNS 50 zwischen den Sequenzbereichen A und B bzw. A' und B' die Sequenz S1 bzw. S1' und/oder die Sequenz S2 bzw. S2' aufweist.
- 25 Da die Sonden-Sequenzen bspw. für eine bestimmte Spezies spezifisch sein können, kann mit diesem Verfahren der Nachweis der Anwesenheit einer bestimmten Spezies in einer Probe erbracht werden.

- Figur 15 zeigt die schematische Darstellung der sekundären und tertiären
- 30 Amplifikationsprodukte 61, 62 und 63, die mittels der Vorrichtung 20 erzeugbar sind. Die Menge an sekundärem Amplifikationsprodukt 61 und 62 wird dabei ab dem zweiten Reaktionszyklus innerhalb des Kapillarspalts 7 mit jedem Zyklus nahezu verdoppelt, so daß die Konzentration an sekundärem Amplifikationsprodukt nach einigen
- 35 Zyklen ausreicht, um an die Sonden 56, 57, die an den Spots 13 immobilisiert sind, zu hybridisieren, wobei eine Verlängerung der

- 19 -

5 Sonden 56, 57 komplementär zum sekundären Amplifikationsprodukt 61, 62 stattfindet. Dieses tertiäre Amplifikationsprodukt 63 aus Sonden 56, 57 und sekundären Amplifikationsprodukt 61, 62 kann bspw. über ein Label 60, das an die eingesetzten Primer 53, 54 gekoppelt ist, mittels Fluoreszenzdetektion nachgewiesen werden.

In einem ersten Anwendungsbeispiel soll der spezifische Nachweis von einzelnen Mikroorganismenspezies beschrieben werden:

10 Der Chip 2 der Vorrichtung 20 ist in diesem Beispiel ein DNA-Chip und dient, während oder nach der DNS-Amplifikation, der Detektion der Verstärkungsprodukte und ggf.auch der Bereitstellung von festphasen gekoppelten DNS-Primern (Abb. 14 und 15). Bspw. wird eine Sequenz S1 die spezifisch ist für eine Spezies (z.B. *Escherichia coli*) durch den
15 thermischen Amplifikationsprozeß (z.B. PCR) so häufig aus einer Vielzahl von möglichen Targets heraus kopiert, daß die sichere Erkennung dieser Sequenz durch Hybridisierung an den Sonden 56, 57, 58 und 59 und Fluoreszenzmessung auf der Detektionsfläche 12 möglich wird. Sind mehrere Sequenzen bekannt, die jeweils spezifisch sind für
20 z.B. eine Spezies, einen Stamm oder eine Krankheit und die alle zwischen zwei konservierten, in allen Fällen identischen Bereichen liegen, so lassen sich durch Immobilisierung der entsprechenden Sonden auf dem Chip 2 alle Spezies, Stämme bzw. Krankheiten parallel mit nur einer thermischen Amplifikationsreaktion in der Vorrichtung 20
25 nachweisen. Durch Verwendung von mehreren Primerpaaren 53, 54 läßt sich der Anwendungsbereich erweitern. Die Fluoreszenzdetektion der tertiären Amplifikationsprodukte 63 erfolgt im einfachsten Fall durch Fluoreszenzmarkierung 60 der Primer 53, 54. Andere Markierungsarten, wie bspw. Interkalatoren, Radioisotope, FRET-Systeme,
30 fluoreszenzmarkierte Nukleotide usw. sind dadurch nicht ausgeschlossen.

Der in der Vorrichtung 20 ablaufende molekularbiologische Prozeß soll nachfolgend anhand der Abb.14 und 15 beschrieben werden.

35 Die einer biologischen Probe entstammende Target DNS 50 wird zusammen mit Primern 53, 54, die gelabelt sein können 60, in das Probenreservoir (den Kapillarspalt) 7 gegeben. Die Spots 13 des Chips 2

- 20 -

auf der Detektionsfläche 12 tragen über Spacer 55 Sonden-DNS mit Sequenzen S1, S1', S2, S2' usw., die dadurch charakterisiert sind, daß sie komplementär zu denen sein können, die in der Target-DNS 50 vorkommen. In dem in Abb. 14 dargestellten Beispiel beinhaltet die Target-DNS 50 Sequenzen, die komplementär zu den Sonden 56 und 57 sind. Jede Sequenz S1, S1' und S2, S2' usw. der Sonden (56, 57, 58, 59) wurde so gewählt, daß sie spezifisch für eine spezielle Fragestellung ist. Gilt es zum Beispiel bestimmte Krankheitserreger mittels der Vorrichtung 20 zu detektieren, so seien S1 und S1' spezifisch für den Erreger *Bacillus cereus*, S2 und S2' für den Erreger *Campylobacter jejuni* usw.. Befindet sich lediglich der Erreger *Bacillus cereus* in einer Stuhlprobe, so wird sich nach der sachgerechten Aufarbeitung der Probe eine Target-DNS 50 in der Probenflüssigkeit befinden, die nur die Sequenzen S1 und S1' beinhaltet. Um diese nun detektierbar auf der Detektionsfläche 12 zur Hybridisierung zu bringen, muß im allgemeinen die Anzahl der Kopien an Target-DNS 50 signifikant erhöht werden. Daher wird eine rauschunterdrückende, spezifische DNS-Amplifikationsmethode in dem Probenreservoir (Kapillarspalt) 7 durchgeführt. Zu diesem Zweck werden zwei Primer 53, 54 mit Sequenzen A und B', die für alle Erreger gleich sind ausgesucht, die alle möglichen erregerspezifischen Sonden-Sequenzen (S1, S2, S3 ...) einrahmen (so wie in Abb. 14 die Sequenzen S1 bzw. S1' von den Sequenzen A und B' eingerahmt werden). Dann wird, wie bei der PCR, die Target-DNS 50 bei ca. 90 °C denaturiert, die Primer 53, 54 anealen bei ca. 65°C an B bzw. A' und es wird bei ca. 70°C eine Primer-Extensions-Reaktion durchgeführt, die die Target DNS 51, 52 doppelsträngig macht. Das erhaltene Produkt ist dann das primäre Amplifikationsprodukt mit der Sequenz A,X,S1,X,B,Y bzw. B',X,S1',X,A',Y. Es wird der Zyklus aus Denaturierung, Anealen und Extension wiederholt, woraufhin man das sekundäre Amplifikationsprodukt 61, 62 (siehe Abb.15) erhält. Durch erneutes mehrfaches Wiederholen des Amplifikationszykluses wird die Zahl der sekundären Amplifikationsprodukte 61, 62 jeweils nahezu verdoppelt. Dadurch steigt die Konzentration an DNS, die die Sequenzen S1 und S1' beinhalten derart an, daß eine sichere Detektion der Hybridisierung an den Sonden 56, 57 möglich wird. Unspezifisch an den Spots bindende

- 21 -

DNS, die sich noch in der Probenflüssigkeit befindet, wird von dem Amplifikationsprozeß nicht erfaßt, wodurch die Selektivität des Gesamtverfahrens stark erhöht wird.

Auf diese Weise wird hochspezifisch und hochempfindlich *Bacillus cereus* nachgewiesen. Anstelle des PCR Protokolls können auch andere Verstärkungsverfahren zu Anwendung gelangen.

Durch den Einbau der Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in das Analysesystem 200 (Abb. 11) besteht die Möglichkeit, die Prozesse der Aufarbeitung von Proben automatisch und kontinuierlich durchzuführen.

In einem zweiten Anwendungsbeispiel soll ein paralleler Nachweis von bakteriellen Erregern in Stuhlproben beschrieben werden:

Der Chip 2 der Vorrichtung 20 ist bei diesem Beispiel ein DNA-Chip und dient dem parallelen Nachweis mehrerer bakterieller Erreger in humanen oder tierischen Stuhlproben.

Aus jeder Stuhlprobe wird die Gesamt DNS mittels Standardtechniken (z.B. mit Hilfe des dafür vorgesehenen Kits der Firma Qiagen) isoliert. Die DNA wird in ein für die Anwendung in der Vorrichtung 20 geeignetes Volumen eines standardisierten, gegebenenfalls kommerziell verfügbaren Puffersystemes aufgenommen, in dem eine PCR-Amplifikation durchgeführt werden kann. Dieses enthält neben der Pufferkomponente mindestens eine thermostabile Polymerase, ein gegebenenfalls isomolares Gemisch der vier natürlichen Desoxynukleotidtriphosphate, ein divalentes Salz, gegebenenfalls Komponenten zur Steigerung der Effektivität der PCR, sowie Bausteine zum Labeln der PCR-Produkte (z.B. fluoreszenz- Biotin- oder ähnlich markierte Desoxynukleotidtriphosphate).

Für den Nachweis der Organismen findet ein Chip 2 Verwendung, auf dessen Oberfläche Oligonukleotid Sonden 56, 57, 58, 59 immobilisiert sind, die komplementär zu einem oder mehreren variablen Bereichen der 16S rRNS Gene und/oder der 23S rRNS Gene und/oder der innergenischen Bereiche zwischen 16S und 23S rRNS Gen verschiedener nachzuweisender Organismen sind. Die Sonden 56, 57, 58, 59 sind beispielsweise gerichtet gegen eine oder mehrere der entsprechenden Sequenzen von *Aeromonas spec.* und/oder

- 22 -

Bacillus cereus und/oder *Campylobacter jejuni* und/oder *Clostridium difficile* und/oder *Clostridium perfringens* und/oder *Plesiomonas shigelloides* und/oder *Salmonella spec.* und/oder *Shigella spec.* und/oder *Staphylococcus aureus* und/oder *Tropheryma whippelii* und/oder *Vibrio cholerae* und/oder *Vibrio parahaemolyticus* und/oder *Yersinia enterocolitica*.

Die Oligonukleotid Sonden 56, 57, 58, 59 werden in Spots 13 angeordnet, so daß jeder einzelne Spot 13 eine Vielzahl von Oligonukleotid Sonden (z.B. die Sonde 56) der gleichen Sequenz enthält.

Die Immobilisierung der Sonden 56, 57, 58, 59 erfolgt entweder an deren 3'-Ende oder am 5' Ende bzw. an einer internen Position, wobei gegebenenfalls das 3' Ende der Sonden 56, 57, 58, 59 z.B. durch Aminierung blockiert wird, so daß es als Substrat für DNS-Polymerasen nicht dienen kann.

Die Auswahl der Sonden 56, 57, 58, 59 erfolgt so, daß einerseits jede der Sonden eine hohe Sequenzspezifität für den zu detektierenden Organismus aufweist und andererseits in den Genomen der Keime in einer geringen Distanz von der Bindungsstelle der spezifischen Sonden Motive existieren, die für alle oder für Gruppen der zu detektierenden Organismen die gleiche Sequenz besitzen.

Gegen diese Motive werden universelle Primer 53, 54 gerichtet, die dazu geeignet sind, bei allen nachzuweisenden Organismen einen Sequenzabschnitt, der die Bindungsstelle der auf dem Chip 2 immobilisierten Sonden enthält, mittels PCR zu amplifizieren. Diese Primer 53, 54 werden der, aus der Stuhlprobe isolierten, in der Amplifikationslösung (Probenflüssigkeit 19) aufgenommenen DNS, zugesetzt. Gegebenenfalls kann der Primer 53, 54, der während der nachfolgenden PCR Amplifikation die Synthese des Stranges spezifiziert, der die zur auf dem Chip 2 immobilisierten Probe komplementäre Sequenz enthält als markierte Komponente zugesetzt werden.

Das Amplifikationsgemisch wird in die mit einem beschriebenen Chip 2 versehene Vorrichtung 20 gefüllt. Die Lösung in der Vorrichtung 20 wird einem zyklischen Temperaturregime unterworfen, so daß die Target-DNS 50 nach einem typischen PCR-Mechanismus amplifiziert und gegebenenfalls gleichzeitig markiert wird. Nach hinreichender

- 23 -

Amplifikation erfolgt ein Hybridisierungsschritt, bei dem die mit den universellen Primern 53, 54 amplifizierten Targetsequenzen mit den spezifischen, auf dem Chip 2 immobilisierten Sonden 56, 57, 58, 59 hybridisieren.

5 Nach Abschluß der Reaktion folgt ein Spülschritt, bei dem nicht mit dem Chip verknüpfte und unspezifisch gebundene DNS Moleküle entfernt werden.

Anschließend erfolgt Detektion der auf dem Chip 2 verbliebenen Markierung. In der Stuhl-Probe anwesende Organismen werden über die
10 Markierung der für sie spezifischen Proben-Spots 13 auf dem Chip 2 identifiziert.

Um Probenflüssigkeiten 19 bspw. aus Stuhlproben oder Gewebe zu erhalten sind eine Vielzahl von Aufarbeitungsschritte notwendig. Es
15 müssen Zellen aufgeschlossen werden, Proteine, Lipide und Feststoffe abgetrennt werden und die DNS aufgearbeitet und gereinigt werden. Die für die Verwendung der Vorrichtung notwendigen Enzyme, Primer und sonstigen Substanzen müssen ebenfalls der Probenflüssigkeit 19 zugeführt werden. Diese Schritte lassen sich durch den Einbau der
20 Vorrichtung 20 zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren in das Analysesystem 200, daß u.a. aus Pumpen und Ventilen 28, die die Flüssigkeiten bewegen und Steuern, aus Filtern und Reaktionskammern (Konditionierer 27), in denen die einzelnen Prozeßschritte nacheinander durchgeführt werden und aus
25 Voraratsbehältern 29, die die dazu notwendigen Chemikalien liefern, besteht (gezeigt in Fig. 11), automatisch und kontinuierlich durchführen. Dabei werden die Proben durch einen Pipettierroboter 37 aus einem nicht im einzelnen dargestellten Standardbelieferungssystem in den Gesamteinlaß 25 zur Konditionierung eingefüllt. Die durch das
30 Analysesystem 200 aufgearbeiteten Proben gelangen über den Einlaß 81 in die Vorrichtung 20, so das eine Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren der Proben automatisiert durchgeführt werden kann. Der gesamte Prozeß wird von einem Steuerrechner 35 überwacht, der über einen Rechnerbus 36 mit
35 elektronischen Reglern und Kontrollgeräten 21, 22, 31, 32 verbunden ist.

- 24 -

Alle in der Beschreibung, den nachfolgenden Ansprüchen und der Zeichnung dargestellten Merkmale können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination miteinander erfindungswesentlich sein.

- 25 -

Bezugszeichenliste

- | | | |
|-----|---|--------------------------------------------------|
| 1 | - | Kammerkörper |
| 2 | - | Chip |
| 3 | - | Probenkammer |
| 4 | - | Auflagefläche |
| 5 | - | Kammerträger |
| 6 | - | Gasreservoir |
| 7 | - | Kapillarspalt |
| 81 | - | Einlaß |
| 82 | - | Auslaß |
| 9 | - | Gasreservoirnase |
| 11 | - | Ausnehmung |
| 12 | - | Detektionsfläche |
| 13 | - | Spot |
| 14 | - | Anschlußflächen |
| 15 | - | Leiterbahn |
| 16 | - | Temperaturfühler |
| 17 | - | Mittel zur Temperaturbeaufschlagung |
| 171 | - | Widerstandsleitungen |
| 18 | - | Quadrupol |
| 181 | - | Elektroden |
| 19 | - | Probenflüssigkeit |
| 20 | - | Vorrichtung |
| 21 | - | Temperaturregler |
| 22 | - | Vermischungssteuerung |
| 23 | - | elektrische Leitungen für die Temperaturregelung |
| 24 | - | elektrische Leitungen für die Quadrupolregelung |
| 25 | - | Gesamteinlaß |
| 26 | - | Abfall |
| 27 | - | Konditionierer |
| 28 | - | Pumpen/Ventile |
| 29 | - | Vorratsbehälter |
| 30 | - | Verbindungsschläuche |
| 31 | - | Konditionierersteuerung |
| 32 | - | Automatensteuerung |

- 26 -

- 33 - elektrische Leitungen für die Konditionierersteuerung
- 34 - elektrische Leitungen für die Automatensteuerung.
- 35 - Steuerrechner
- 36 - Rechnerbus
- 37 - Pipettierautomat (Pipettierroboter)
- 38 - Dunkelfeldspiegel
- 39 - Anregungslichtstrahlengang
- 40 - Detektionslichtstrahlengang
- 41 Mikroskopobjektiv
- 42 Berandung
- 43 - Dichtfläche
- 50 - Target-DNS
- 51 - AB Target-DNS
- 52 - A'B' Target-DNS
- 53 - Primer B'
- 54 - Primer A
- 55 - Spacer
- 56 - Sonde S1
- 57 - Sonde S1'
- 58 - Sonde S2
- 59 - Sonde S2'
- 60 - Label
- 61 - sekundäres Amplifikationsprodukt
- 62 - sekundäres Amplifikationsprodukt
- 63 - tertiäres Amplifikationsprodukt
- 200 - Analysesystem
- 1416 - Anschlußflächen des Temperaturfühlers
- 1417 - Anschlußflächen des Heizers
- 1418 - Anschlußflächen des Quadrupols
- 1516 - Leiterbahn des Temperaturfühlers
- 1517 - Leiterbahn Heizers
- 1518 - Leiterbahn Quadrupols
- A-A - Schnittebene
- B-B - Schnittebene
- C-C - Schnittebene
- D-D - Schnittebene
- E-E - Schnittebene

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren bestehend aus einem Kammerkörper (1), der eine Ausnehmung (11) aufweist, deren Berandung (42) einen optisch transparenten Chip (2), der auf einer Detektionsfläche (12) in einzelnen Spots (13) Nukleinsäuren trägt, dichtend erfaßt, wobei der Kammerkörper (1) weiterhin über eine Auflagefläche (4) dichtend auf einem optisch transparenten Kammerträger (5) derart aufgesetzt ist, daß zwischen der dem Kammerträger (5) zugewandten Detektionsfläche (12) des Chips (2) und dem Kammerträger (5) ein mit einer Probenflüssigkeit (19) befüllbarer Kapillarspalt (7) gebildet ist, wobei der Kammerkörper (1) mit einem räumlich voneinander getrennten Einlaß (81) und Auslaß (82) versehen ist und der Kammerkörper (1) einen den Chip (2) seitlich umfassenden Raum, der ein Gasreservoir (6) umschließt, aufweist und der Kammerträger (5) mit Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung (17) versehen ist.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Einlaß (81) und der Auslaß (82) einseitig zum Chip (2) angeordnet und von einer Gasreservoirnase (9) getrennt sind.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Mittel zur Temperaturbeaufschlagung (17) als mikrostrukturierte Heizer ausgebildet sind.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Kammerträger (5) mikrostrukturierte Temperaturfühler (16) vorgesehen sind.
5. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß auf dem Kammerträger (5) wenigstens zwei Elektroden (181) vorgesehen sind, die den Chip (2) gegenüberliegend erfassen und mit der in den Kapillarspalt (7) einbringbaren Probenflüssigkeit (19) in Kontakt bringbar sind.

- 28 -

- 5 6. Vorrichtung nach den Anspruch 1 und 5, dadurch gekennzeichnet, daß die dem Kammerträger (5) zugeordneten Bauelemente (16, 17, 18) in Form optisch transparenter Dünnschichten oder derart fein strukturiert ausgeführt sind, daß die optische Transparenz des Chips (2) zumindest in den Bereichen der Spots (13) im wesentlichen unbeeinflußt bleibt.
- 10 7. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Kammerkörper (1) und der Chip (2) aus Glas und/oder Polycarbonat und/oder Polymethanethylacrylat bestehen.
8. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Kammerträger (5) aus gut wärmeleitenden Material gefertigt ist.
- 15 9. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Auflagefläche (4) mit dem Kammerträger (5) unlösbar durch eine Verklebung oder Verschweißung verbunden ist.
- 20 10. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Auflagefläche (4) mit dem Kammerträger (5) lösbar über eine zusätzliche Dichtfläche (43) verbunden ist.
- 25 11. Vorrichtung nach den Ansprüchen 1 und 10, dadurch gekennzeichnet, daß die zusätzliche Dichtfläche (43) in ihrer Höhe variabel vorgebbar zur definierten Bestimmung der Dicke des Kapillarspalts (7) festgelegt ist.
- 30 12. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Detektionsfläche (12) in Form von Spots (13) ausgebildet ist, an denen Sonden (56, 57, 58, 59) in Form von Nukleinsäuremolekülen immobilisiert sind.
- 35 13. Vorrichtung nach den Ansprüchen 1 und 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden (56, 57, 58, 59) über Spacer (55) immobilisiert sind.

1/10

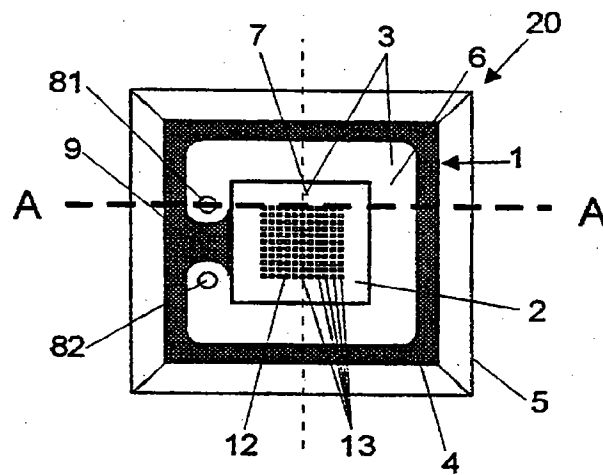


Fig. 1

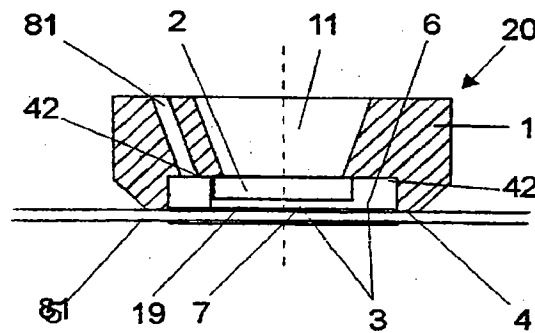


Fig. 2

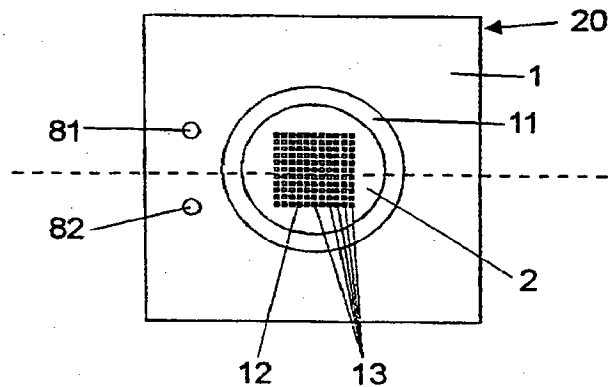


Fig. 3

2/10

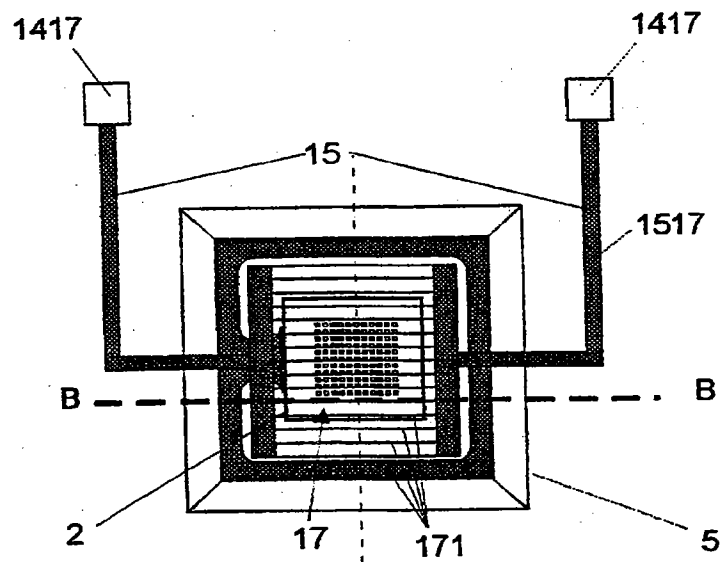


Fig. 4

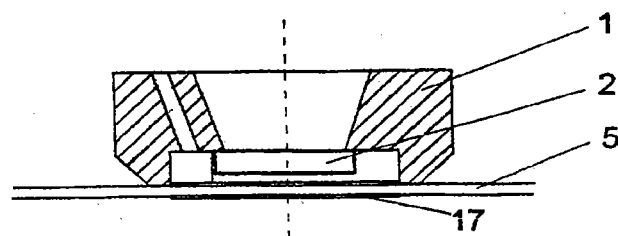


Fig. 5

3/10

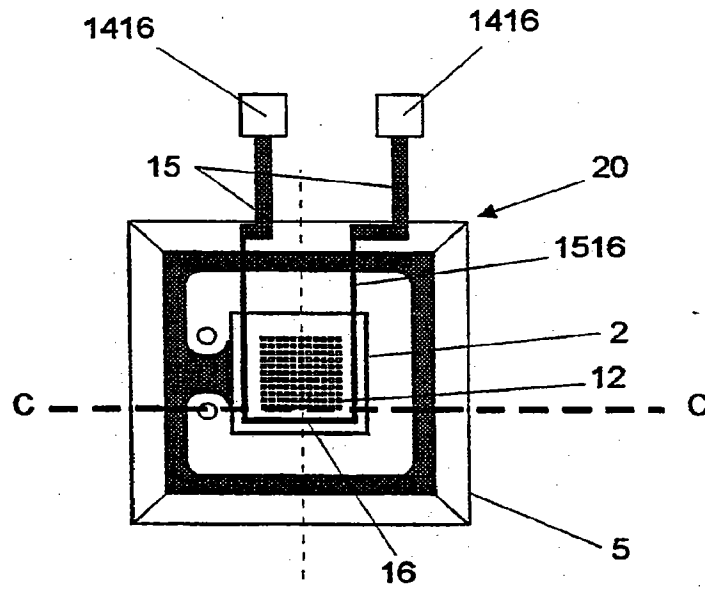


Fig. 6

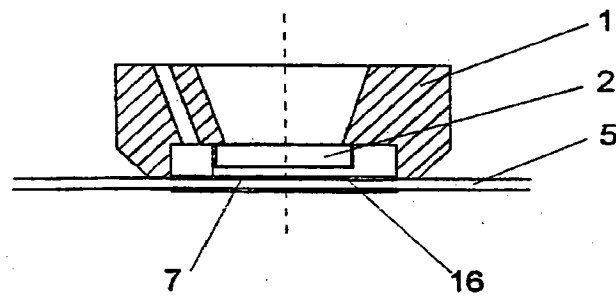


Fig. 7

4/10

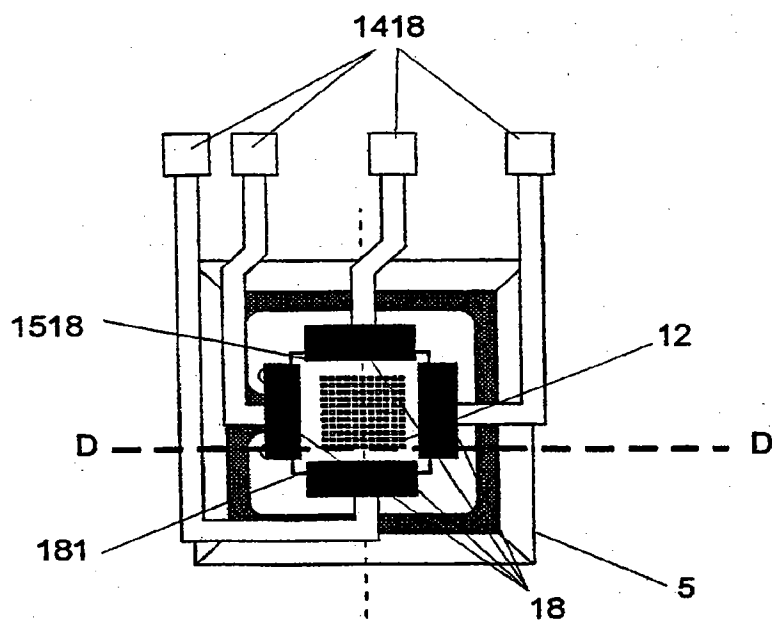


Fig. 8

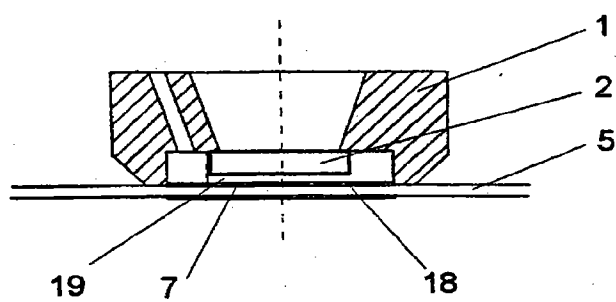


Fig. 9

5/10

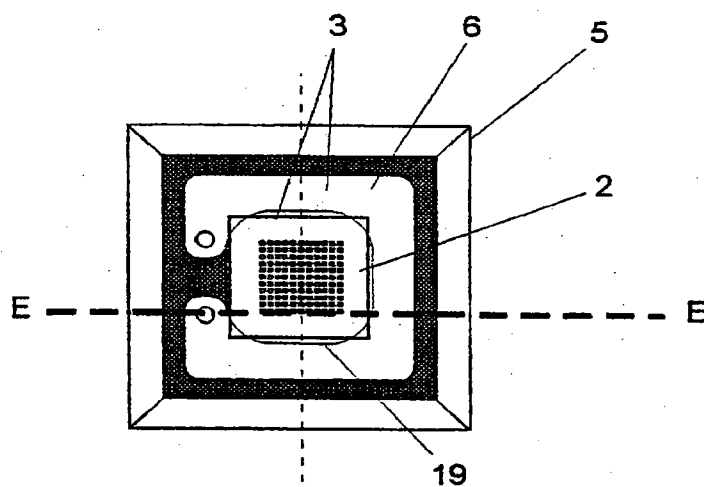


Fig. 10a

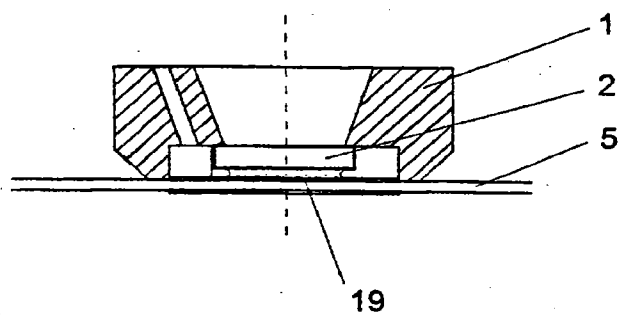


Fig. 10b

6/10

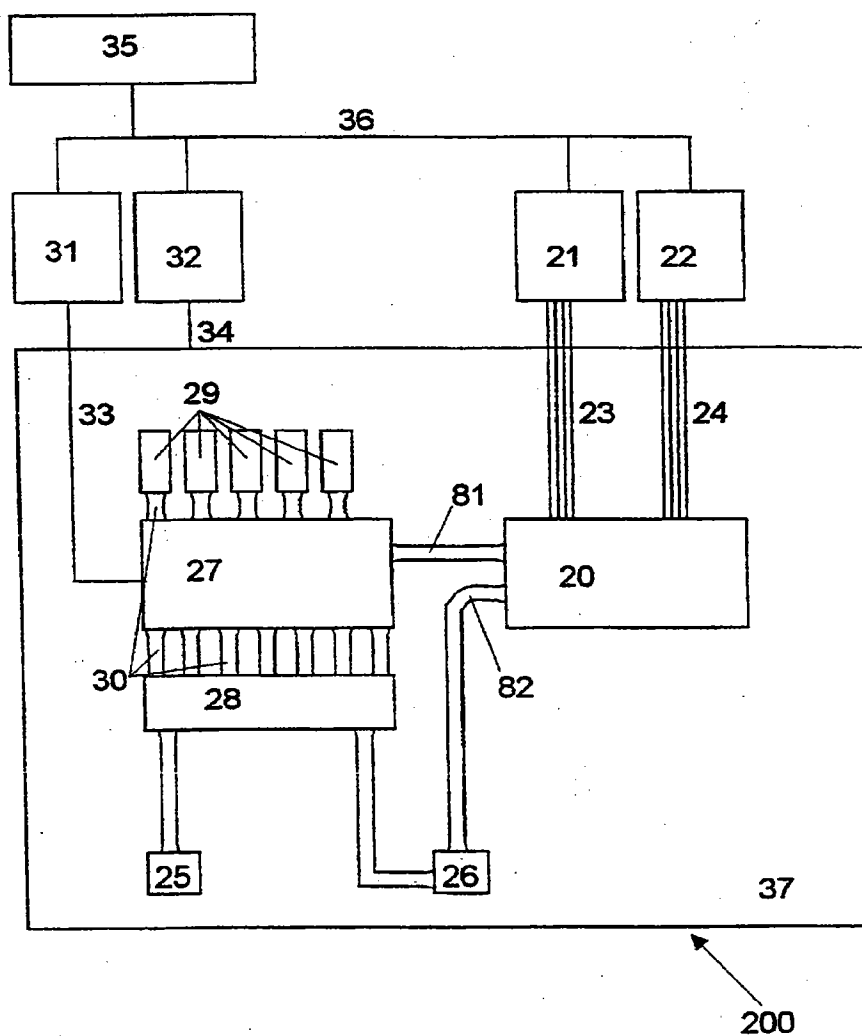


Fig. 11

7/10

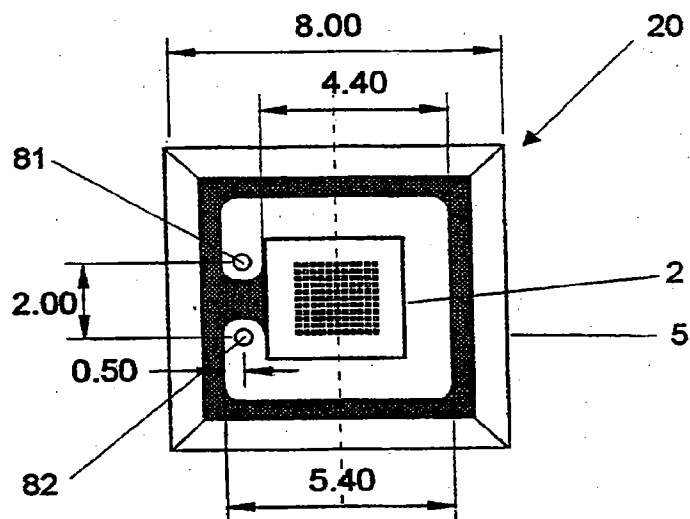


Fig. 12a

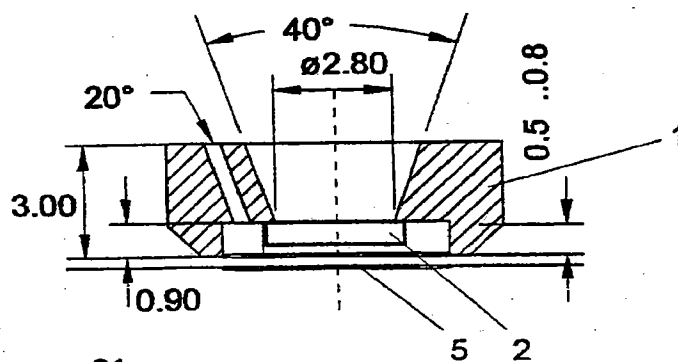


Fig. 12b

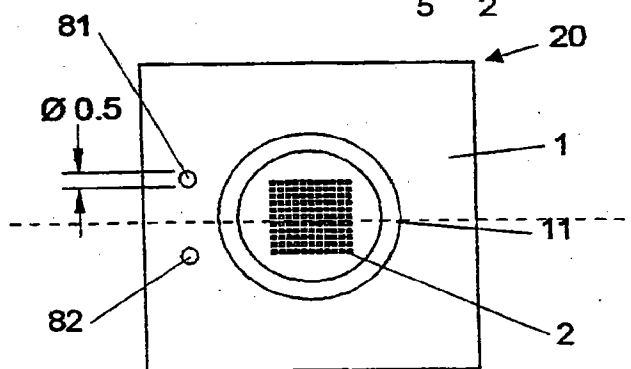


Fig. 12c

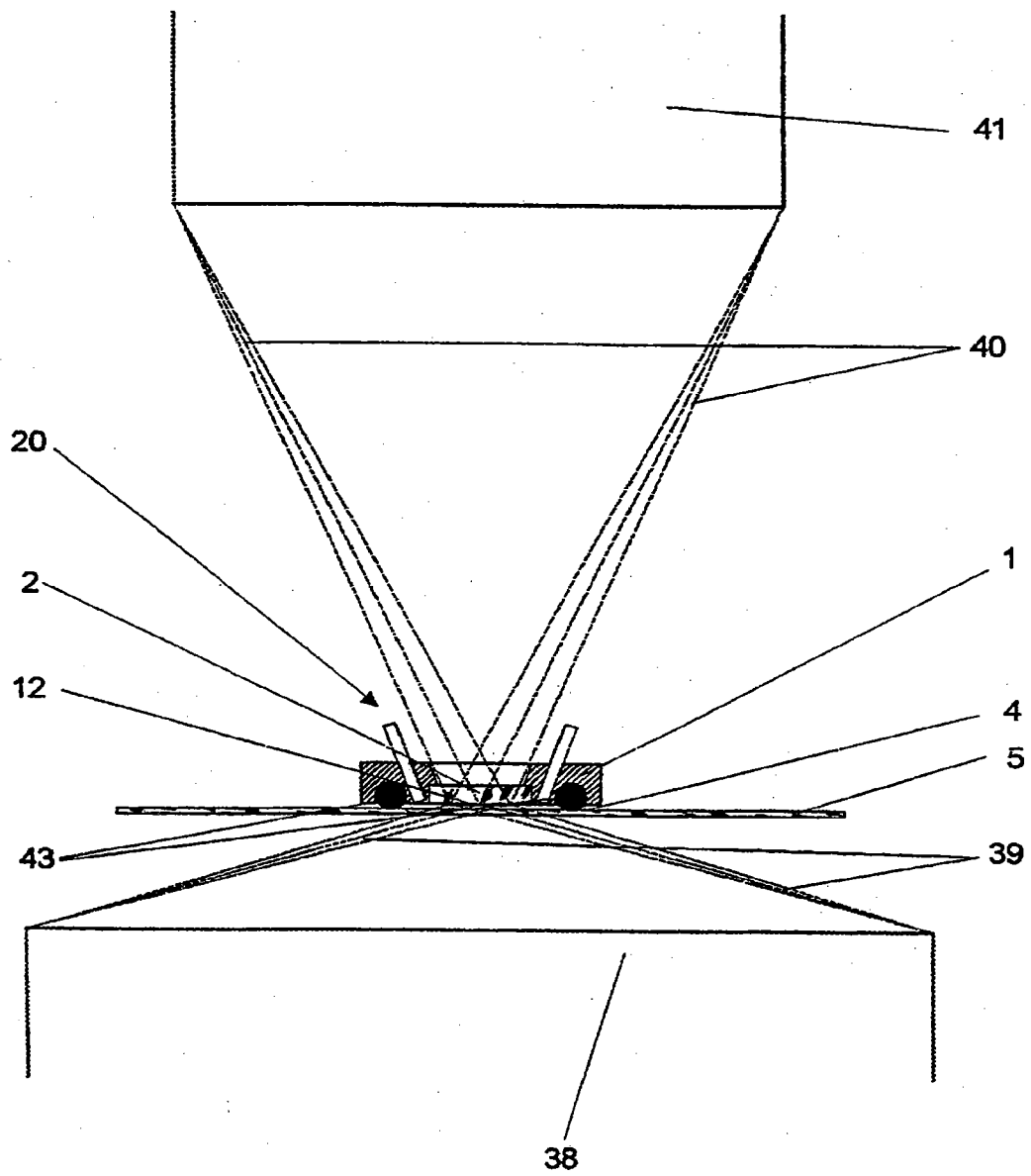


Fig. 13

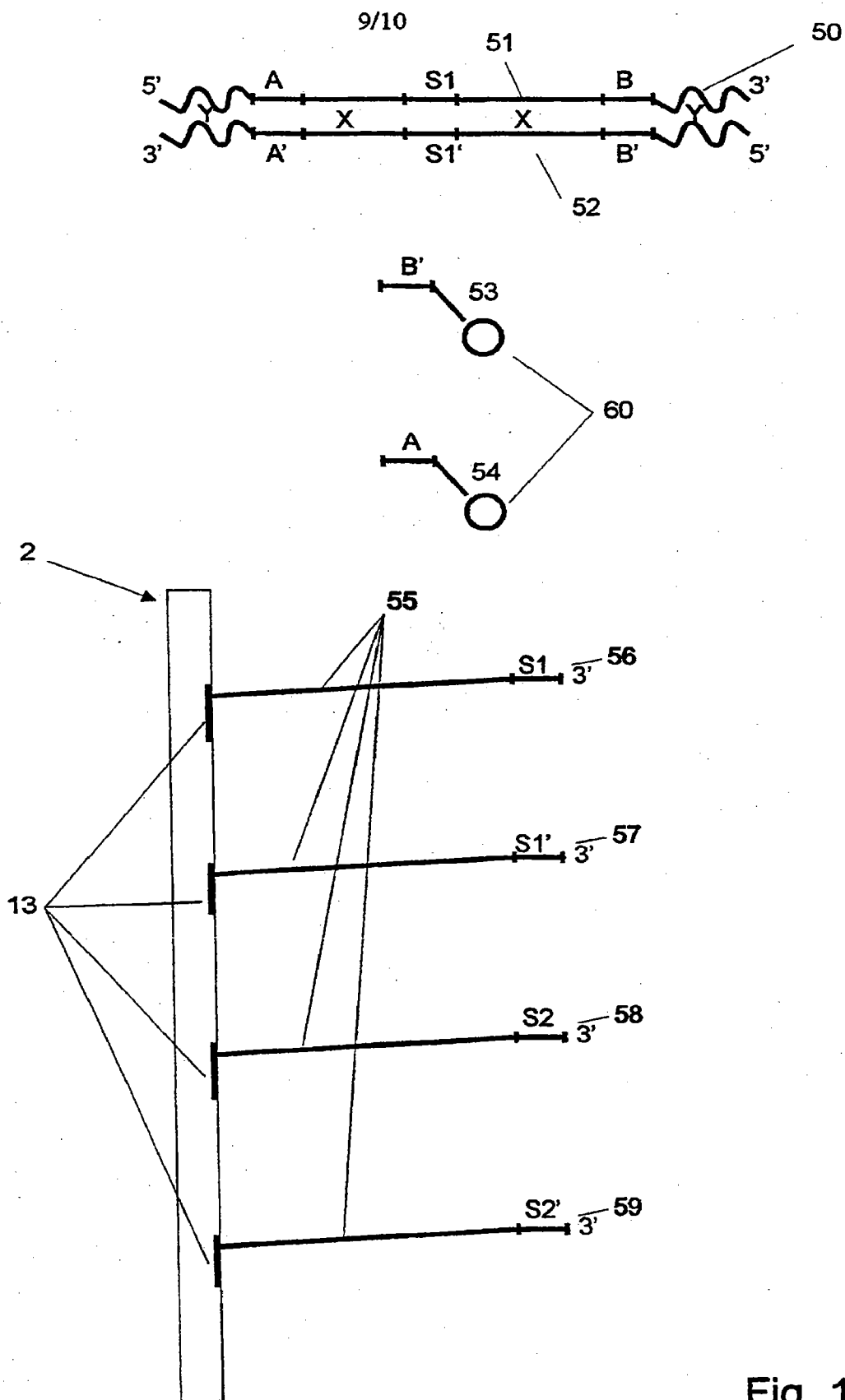


Fig. 14

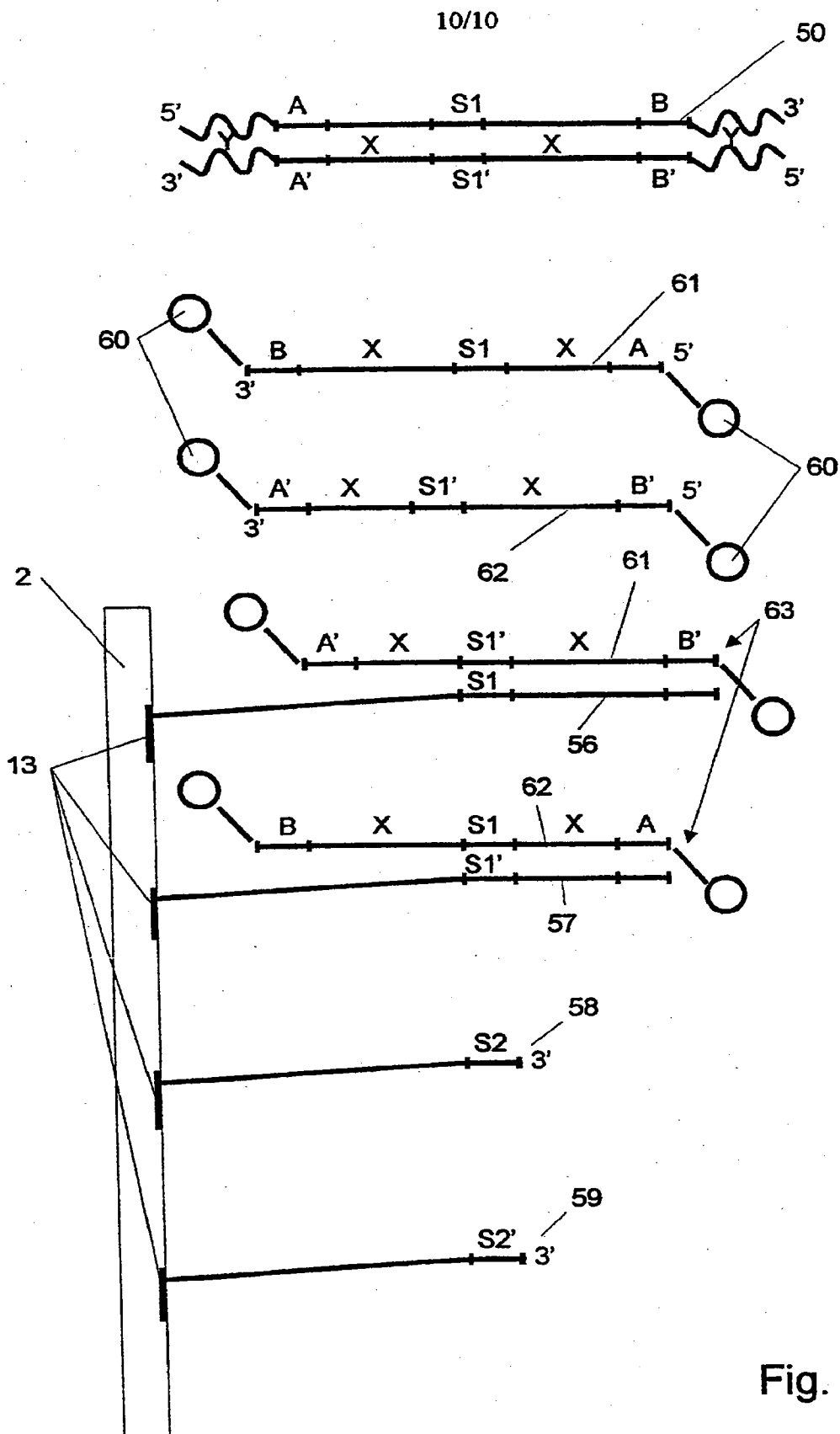


Fig. 15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06103

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 B01L3/00 //C12Q1/68, B01J19/00, G01N21/64, G01N33/55

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q B01L B01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 95 33846 A (AFFYMAX TECH NV ;GOSS VIRGINIA W (US); WINKLER JAMES L (US); BESEM) 14 December 1995 (1995-12-14)</p> <p>page 2, line 13 -page 3, line 3</p> <p>page 6, line 3 -page 7, line 12</p> <p>page 8, line 27 -page 11, line 9</p> <p>page 11, line 29 -page 11, line 37</p> <p>page 14, line 36 -page 14, line 43</p> <p>page 13, line 10 -page 13, line 27</p> <p>page 18, line 32 -page 18, line 37</p> <p>page 21, line 38 -page 22, line 7</p> <p>page 22, line 23 -page 23, line 9</p> <p>page 23, line 20 -page 23, line 26</p> <p>page 24, line 5 -page 24, line 28</p> <p>page 25, line 2 -page 26, line 16</p> <p>figures 27,1-7</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,4,9,12



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 November 2000

Date of mailing of the international search report

08/11/2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 00/06103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 840 113 A (SHIMADZU CORP) 6 May 1998 (1998-05-06) page 2, paragraph 1 page 3, line 21 -page 3, line 46 page 4, line 54 -page 5, line 9 page 5, line 20 -page 5, line 33 figures 1,2	1,4,9,12
A	WO 99 09042 A (CEPHEID) 25 February 1999 (1999-02-25) page 6, line 30 -page 7, line 19 page 9, line 34 -page 9, line 37 page 20, line 8 -page 21, line 9 page 24, line 21 -page 25, line 13 page 26, line 11 -page 27, line 31 page 29, line 23 -page 30, line 15 page 41, line 21 -page 42, line 17 page 43, line 23 -page 44, line 11 figures 1-13	1,3-7
A	US 5 856 174 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) column 2, line 20 -column 2, line 34 column 2, line 48 -column 2, line 57 column 3, paragraphs 1,2 column 10, line 53 -column 11, line 64 column 15, line 9 -column 15, line 48 column 16, line 43 -column 17, line 16 column 17, line 66 -column 18, line 4 column 18, line 26 -column 18, line 62 column 19, line 16 -column 19, line 29 column 19, line 59 -column 20, line 14 column 21, line 26 -column 21, line 41 column 23, line 38 -column 24, line 10 column 24, line 53 -column 25, line 6 column 25, line 42 -column 26, line 15 figures 1-7	1,3,9,12
P,A	DE 199 40 750 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 21 June 2000 (2000-06-21) column 2, line 50 -column 2, line 59 column 3, line 61 -column 4, line 22 column 4, line 33 -column 5, line 17 column 6, line 24 -column 6, line 39 column 13, line 21 -column 13, line 63 column 16, line 52 -column 17, line 10 column 18, line 12 -column 18, line 20 figures 1-3	1,6,7
	-/--	

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No.

PCT/EP 00/06103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>DE 199 50 225 A (LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG) 18 May 2000 (2000-05-18) column 1, line 3 -column 1, line 19 column 3, line 18 -column 3, line 50 column 3, line 61 -column 4, line 35 column 5, line 68 -column 6, line 13 figures 2,9,10</p> <p>-----</p>	1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533846 A	14-12-1995	AU 2943695 A EP 0695941 A EP 0764214 A JP 8166387 A JP 10505410 T US 5945334 A	04-01-1996 07-02-1996 26-03-1997 25-06-1996 26-05-1998 31-08-1999
EP 0840113 A	06-05-1998	JP 10132783 A US 6042708 A	22-05-1998 28-03-2000
WO 9909042 A	25-02-1999	AU 8906698 A EP 1003759 A AU 1947299 A EP 1042061 A WO 9933559 A	08-03-1999 31-05-2000 19-07-1999 11-10-2000 08-07-1999
US 5856174 A	05-01-1999	AU 6404996 A EP 0843734 A JP 11509094 T WO 9702357 A US 6043080 A US 5922591 A	05-02-1997 27-05-1998 17-08-1999 23-01-1997 28-03-2000 13-07-1999
DE 19940750 A	21-06-2000	AU 5625399 A AU 5742499 A AU 5971399 A DE 19940749 A DE 19940751 A DE 19940752 A DE 19940810 A WO 0012123 A WO 0013017 A WO 0013018 A WO 0049142 A	21-03-2000 21-03-2000 21-03-2000 18-05-2000 02-03-2000 27-04-2000 11-05-2000 09-03-2000 09-03-2000 09-03-2000 24-08-2000
DE 19950225 A	18-05-2000	WO 0025171 A	04-05-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01L3/00 //C12Q1/68, B01J19/00, G01N21/64, G01N33/55

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q B01L B01J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>WO 95 33846 A (AFFYMAX TECH NV ; GOSS VIRGINIA W (US); WINKLER JAMES L (US); BESEM) 14. Dezember 1995 (1995-12-14)</p> <p>Seite 2, Zeile 13 -Seite 3, Zeile 3</p> <p>Seite 6, Zeile 3 -Seite 7, Zeile 12</p> <p>Seite 8, Zeile 27 -Seite 11, Zeile 9</p> <p>Seite 11, Zeile 29 -Seite 11, Zeile 37</p> <p>Seite 14, Zeile 36 -Seite 14, Zeile 43</p> <p>Seite 13, Zeile 10 -Seite 13, Zeile 27</p> <p>Seite 18, Zeile 32 -Seite 18, Zeile 37</p> <p>Seite 21, Zeile 38 -Seite 22, Zeile 7</p> <p>Seite 22, Zeile 23 -Seite 23, Zeile 9</p> <p>Seite 23, Zeile 20 -Seite 23, Zeile 26</p> <p>Seite 24, Zeile 5 -Seite 24, Zeile 28</p> <p>Seite 25, Zeile 2 -Seite 26, Zeile 16</p> <p>Abbildungen 27,1-7</p> <p style="text-align: center;">---</p> <p style="text-align: center;">-/--</p>	1,4,9,12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. November 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

08/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

C. (Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>EP 0 840 113 A (SHIMADZU CORP) 6. Mai 1998 (1998-05-06) Seite 2, Absatz 1 Seite 3, Zeile 21 -Seite 3, Zeile 46 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 9 Seite 5, Zeile 20 -Seite 5, Zeile 33 Abbildungen 1,2</p>	1,4,9,12
A	<p>WO 99 09042 A (CEPHEID) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 6, Zeile 30 -Seite 7, Zeile 19 Seite 9, Zeile 34 -Seite 9, Zeile 37 Seite 20, Zeile 8 -Seite 21, Zeile 9 Seite 24, Zeile 21 -Seite 25, Zeile 13 Seite 26, Zeile 11 -Seite 27, Zeile 31 Seite 29, Zeile 23 -Seite 30, Zeile 15 Seite 41, Zeile 21 -Seite 42, Zeile 17 Seite 43, Zeile 23 -Seite 44, Zeile 11 Abbildungen 1-13</p>	1,3-7
A	<p>US 5 856 174 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 5. Januar 1999 (1999-01-05) Spalte 2, Zeile 20 -Spalte 2, Zeile 34 Spalte 2, Zeile 48 -Spalte 2, Zeile 57 Spalte 3, Absätze 1,2 Spalte 10, Zeile 53 -Spalte 11, Zeile 64 Spalte 15, Zeile 9 -Spalte 15, Zeile 48 Spalte 16, Zeile 43 -Spalte 17, Zeile 16 Spalte 17, Zeile 66 -Spalte 18, Zeile 4 Spalte 18, Zeile 26 -Spalte 18, Zeile 62 Spalte 19, Zeile 16 -Spalte 19, Zeile 29 Spalte 19, Zeile 59 -Spalte 20, Zeile 14 Spalte 21, Zeile 26 -Spalte 21, Zeile 41 Spalte 23, Zeile 38 -Spalte 24, Zeile 10 Spalte 24, Zeile 53 -Spalte 25, Zeile 6 Spalte 25, Zeile 42 -Spalte 26, Zeile 15 Abbildungen 1-7</p>	1,3,9,12
P, A	<p>DE 199 40 750 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 21. Juni 2000 (2000-06-21) Spalte 2, Zeile 50 -Spalte 2, Zeile 59 Spalte 3, Zeile 61 -Spalte 4, Zeile 22 Spalte 4, Zeile 33 -Spalte 5, Zeile 17 Spalte 6, Zeile 24 -Spalte 6, Zeile 39 Spalte 13, Zeile 21 -Spalte 13, Zeile 63 Spalte 16, Zeile 52 -Spalte 17, Zeile 10 Spalte 18, Zeile 12 -Spalte 18, Zeile 20 Abbildungen 1-3</p>	1,6,7
	<p>----</p> <p>-/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	<p>DE 199 50 225 A (LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Spalte 1, Zeile 3 -Spalte 1, Zeile 19 Spalte 3, Zeile 18 -Spalte 3, Zeile 50 Spalte 3, Zeile 61 -Spalte 4, Zeile 35 Spalte 5, Zeile 68 -Spalte 6, Zeile 13 Abbildungen 2,9,10 -----</p>	1,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9533846 A	14-12-1995	AU 2943695 A EP 0695941 A EP 0764214 A JP 8166387 A JP 10505410 T US 5945334 A	04-01-1996 07-02-1996 26-03-1997 25-06-1996 26-05-1998 31-08-1999
EP 0840113 A	06-05-1998	JP 10132783 A US 6042708 A	22-05-1998 28-03-2000
WO 9909042 A	25-02-1999	AU 8906698 A EP 1003759 A AU 1947299 A EP 1042061 A WO 9933559 A	08-03-1999 31-05-2000 19-07-1999 11-10-2000 08-07-1999
US 5856174 A	05-01-1999	AU 6404996 A EP 0843734 A JP 11509094 T WO 9702357 A US 6043080 A US 5922591 A	05-02-1997 27-05-1998 17-08-1999 23-01-1997 28-03-2000 13-07-1999
DE 19940750 A	21-06-2000	AU 5625399 A AU 5742499 A AU 5971399 A DE 19940749 A DE 19940751 A DE 19940752 A DE 19940810 A WO 0012123 A WO 0013017 A WO 0013018 A WO 0049142 A	21-03-2000 21-03-2000 21-03-2000 18-05-2000 02-03-2000 27-04-2000 11-05-2000 09-03-2000 09-03-2000 09-03-2000 24-08-2000
DE 19950225 A	18-05-2000	WO 0025171 A	04-05-2000

GEÄNDERTE FASSUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
11. Januar 2001 (11.01.2001)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 01/02094 A1

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **B01L 3/00 //**
C12Q 1/68, B01J 19/00, G01N 21/64, 33/552

(21) Internationales Aktenzeichen: **PCT/EP00/06103**

(22) Internationales Anmeldedatum:
30. Juni 2000 (30.06.2000)

(25) Einreichungssprache: **Deutsch**

(26) Veröffentlichungssprache: **Deutsch**

(30) Angaben zur Priorität:
199 32 423.9 2. Juli 1999 (02.07.1999) **DE**

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme
von US): **CLONDIAG CHIP TECHNOLOGIES
GMBH [DE/DE];** Löbstedter Str. 105, D-07743 Jena
(DE).

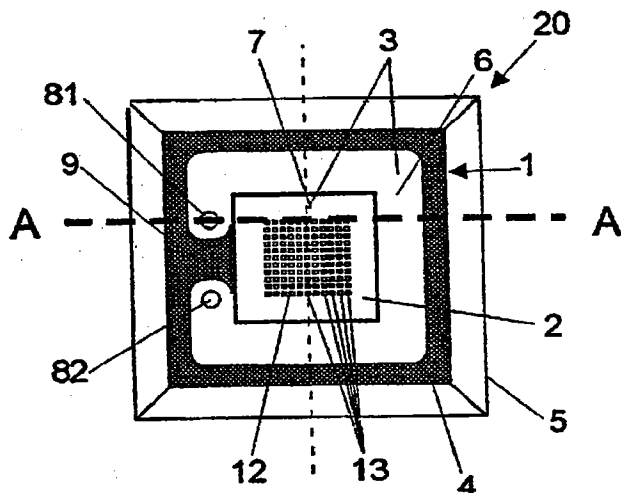
(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): **EHRICHT, Ralf
[DE/DE];** Rosenstr.8, D-07749 Jena (DE). **ELLINGER,
Thomas [DE/DE];** Ottogerd-Mühlmann-Str. 19, D-07743
Jena (DE). **TUCHSCHERER, Jens [DE/DE];** Neu-
gasse 13, D-07743 Jena (DE). **ERMANTRAUT, Eugen
[DE/DE];** Mühlenstr. 40, D-07745 Jena (DE). **POSER,
Siegfried [DE/DE];** Schlippenstr. 19, D-07749 Jena
(DE).

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: MICROCHIP MATRIX DEVICE FOR DUPLICATING AND CHARACTERIZING NUCLEIC ACIDS

(54) Bezeichnung: MICROCHIP-MATRIX-VORRICHTUNG ZUR VERVIELFÄLTIGUNG UND CHARAKTERISIERUNG
VON NUKLEINSÄUREN



(57) Abstract: The aim of the invention is to provide a device for duplicating and characterizing nucleic acids almost simultaneously and with a high sample throughput rate, hereby avoiding the disadvantages of the prior art. To this end, the inventive device consists of a chamber body (1) with a recess whose edge sealingly holds an optically transparent chip (2). Said chip holds nucleic acids in individual spots (13) on a detection surface (12). The chamber body (1) is placed on an optically transparent chamber support (5) with a bearing surface (4), in such a way that a capillary gap (7), which can be filled with a liquid sample, is formed between the detection surface (12) of the chip (2) facing towards the chamber support (5) and said chamber support (5). The chamber body (1) is provided with an inlet (81) and an outlet (82), which are spatially separate from each other, and has a space, which laterally encompasses the chip (2) and which has a gas reservoir (6). The chamber support (5) is provided with heating elements.

(57) Zusammenfassung: Die Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zur Vervielfältigung und Charakterisierung von Nukleinsäuren anzugeben, die eine nahezu gleichzeitige Vervielfältigung und Charakterisierung mit einem hohen Probendurchsatz ermöglicht, und somit die Nachteile des Standes der Technik vermeidet, wird dadurch gelöst, dass die Vorrichtung aus einem Kammerkörper (1), der eine Ausnehmung aufweist, deren Berandung einen optisch transparenten Chip (2), der auf einer Detektionsfläche (12) in einzelnen Spots (13) Nukleinsäuren trägt, dichtend erfasst, wobei der Kammerkörper (1) weiterhin über eine Auflagefläche (4) dichtend auf einem optisch transparenten Kammerträger (5) derart aufgesetzt ist, dass zwischen der dem Kammerträger (5) zugewandten Detektionsfläche (12) des Chips (2) und dem Kammerträger (5) ein mit einer Probenflüssigkeit befüllbarer Kapillarspalt (7) gebildet ist, wobei der Kammerkörper (1) mit einem räumlich voneinander getrennten Einlass (81) und Auslass (82) versehen ist und der Kammerkörper (1) einen den Chip (2) seitlich umfassenden Raum, der ein Gasreservoir (6) umschließt, aufweist und der Kammerträger (5) mit Mitteln zur Temperaturbeaufschlagung versehen ist, besteht.

WO 01/02094 A1



(DE). SCHULZ, Torsten [DE/DE]; Nollendorfer Str. 11,
D-07743 Jena (DE).

Veröffentlicht:

— Mit internationalem Recherchenbericht.

(74) **Anwalt:** PFEIFFER, Rolf-Gerd; Pfeiffer & Partner,
Winzerlaer Str. 10, D-07745 Jena (DE).

(88) **Veröffentlichungsdatum des geänderten
internationalen Recherchenberichts:** 21. Juni 2001

(81) **Bestimmungsstaaten (national):** AE, AG, AL, AM, AU,
AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CN, CR, CU, CZ, DM, DZ,
EE, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG,
KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LV, MA, MD, MG, MK,
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL,
TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(15) **Informationen zur Berichtigung:**
siehe PCT Gazette Nr. 25/2001 vom 21. Juni 2001, Section
II

(84) **Bestimmungsstaaten (regional):** europäisches Patent (AT,
BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC,
NL, PT, SE).

*Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen
Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on
Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe
der PCT-Gazette verwiesen.*

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 B01L3/00 //C12Q1/68,B01J19/00,G01N21/64,G01N33/552

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12Q B01L B01J G01N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>WO 95 33846 A (AFFYMAX TECH NV ;GOSS VIRGINIA W (US); WINKLER JAMES L (US); BESEM) 14 December 1995 (1995-12-14)</p> <p>page 2, line 13 -page 3, line 3</p> <p>page 6, line 3 -page 7, line 12</p> <p>page 8, line 27 -page 11, line 9</p> <p>page 11, line 29 -page 11, line 37</p> <p>page 14, line 36 -page 14, line 43</p> <p>page 13, line 10 -page 13, line 27</p> <p>page 18, line 32 -page 18, line 37</p> <p>page 21, line 38 -page 22, line 7</p> <p>page 22, line 23 -page 23, line 9</p> <p>page 23, line 20 -page 23, line 26</p> <p>page 24, line 5 -page 24, line 28</p> <p>page 25, line 2 -page 26, line 16</p> <p>figures 27,1-7</p> <p>---</p> <p>-/--</p>	1,4,9,12

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

16 January 2001

Date of mailing of the international search report

8 November 2000

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Koch, A

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter- national Application No

PCT/EP 00/06103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	EP 0 840 113 A (SHIMADZU CORP) 6 May 1998 (1998-05-06) page 2, paragraph 1 page 3, line 21 -page 3, line 46 page 4, line 54 -page 5, line 9 page 5, line 20 -page 5, line 33 figures 1,2 ---	1,4,9,12
A	WO 99 09042 A (CEPHEID) 25 February 1999 (1999-02-25) page 6, line 30 -page 7, line 19 page 9, line 34 -page 9, line 37 page 20, line 8 -page 21, line 9 page 24, line 21 -page 25, line 13 page 26, line 11 -page 27, line 31 page 29, line 23 -page 30, line 15 page 41, line 21 -page 42, line 17 page 43, line 23 -page 44, line 11 figures 1-13 ---	1,3-7
A	US 5 856 174 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 5 January 1999 (1999-01-05) column 2, line 20 -column 2, line 34 column 2, line 48 -column 2, line 57 column 3, paragraphs 1,2 column 10, line 53 -column 11, line 64 column 15, line 9 -column 15, line 48 column 16, line 43 -column 17, line 16 column 17, line 66 -column 18, line 4 column 18, line 26 -column 18, line 62 column 19, line 16 -column 19, line 29 column 19, line 59 -column 20, line 14 column 21, line 26 -column 21, line 41 column 23, line 38 -column 24, line 10 column 24, line 53 -column 25, line 6 column 25, line 42 -column 26, line 15 figures 1-7 ---	1,3,9,12
P,A	DE 199 40 750 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 21 June 2000 (2000-06-21) column 2, line 50 -column 2, line 59 column 3, line 61 -column 4, line 22 column 4, line 33 -column 5, line 17 column 6, line 24 -column 6, line 39 column 13, line 21 -column 13, line 63 column 16, line 52 -column 17, line 10 column 18, line 12 -column 18, line 20 figures 1-3 --- -/--	1,6,7

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Inter: nal Application No
PCT/EP 00/06103

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,A	<p>DE 199 50 225 A (LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG) 18 May 2000 (2000-05-18) column 1, line 3 -column 1, line 19 column 3, line 18 -column 3, line 50 column 3, line 61 -column 4, line 35 column 5, line 68 -column 6, line 13 figures 2,9,10 -----</p>	1,6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP 00/06103

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9533846 A	14-12-1995	AU 2943695 A	04-01-1996
		EP 0695941 A	07-02-1996
		EP 0764214 A	26-03-1997
		JP 8166387 A	25-06-1996
		JP 10505410 T	26-05-1998
		US 5945334 A	31-08-1999
		US 6140044 A	31-10-2000
EP 0840113 A	06-05-1998	JP 3077609 B	14-08-2000
		JP 10132783 A	22-05-1998
		US 6042708 A	28-03-2000
WO 9909042 A	25-02-1999	AU 8906698 A	08-03-1999
		EP 1003759 A	31-05-2000
		AU 1947299 A	19-07-1999
		EP 1042061 A	11-10-2000
		WO 9933559 A	08-07-1999
US 5856174 A	05-01-1999	AU 6404996 A	05-02-1997
		EP 0843734 A	27-05-1998
		JP 11509094 T	17-08-1999
		WO 9702357 A	23-01-1997
		US 6043080 A	28-03-2000
		US 5922591 A	13-07-1999
DE 19940750 A	21-06-2000	AU 5625399 A	21-03-2000
		AU 5742499 A	21-03-2000
		AU 5971399 A	21-03-2000
		DE 19940749 A	18-05-2000
		DE 19940751 A	02-03-2000
		DE 19940752 A	27-04-2000
		DE 19940810 A	11-05-2000
		WO 0012123 A	09-03-2000
		WO 0013017 A	09-03-2000
		WO 0013018 A	09-03-2000
		WO 0049142 A	24-08-2000
DE 19950225 A	18-05-2000	WO 0025171 A	04-05-2000
		EP 1049952 A	08-11-2000

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internat. Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 7 B01L3/00 //C12Q1/68, B01J19/00, G01N21/64, G01N33/552

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 C12Q B01L B01J G01N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, WPI Data, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	WO 95 33846 A (AFFYMAX TECH NV ;GOSS VIRGINIA W (US); WINKLER JAMES L (US); BESEM) 14. Dezember 1995 (1995-12-14) Seite 2, Zeile 13 -Seite 3, Zeile 3 Seite 6, Zeile 3 -Seite 7, Zeile 12 Seite 8, Zeile 27 -Seite 11, Zeile 9 Seite 11, Zeile 29 -Seite 11, Zeile 37 Seite 14, Zeile 36 -Seite 14, Zeile 43 Seite 13, Zeile 10 -Seite 13, Zeile 27 Seite 18, Zeile 32 -Seite 18, Zeile 37 Seite 21, Zeile 38 -Seite 22, Zeile 7 Seite 22, Zeile 23 -Seite 23, Zeile 9 Seite 23, Zeile 20 -Seite 23, Zeile 26 Seite 24, Zeile 5 -Seite 24, Zeile 28 Seite 25, Zeile 2 -Seite 26, Zeile 16 Abbildungen 27,1-7 --- -/-	1,4,9,12



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

- * Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :
- "A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist
- "E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist
- "L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)
- "O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht
- "P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

- "T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist
- "X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden
- "Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist
- "&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. November 2000

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

08/11/2000

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Koch, A

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>EP 0 840 113 A (SHIMADZU CORP) 6. Mai 1998 (1998-05-06) Seite 2, Absatz 1 Seite 3, Zeile 21 -Seite 3, Zeile 46 Seite 4, Zeile 54 -Seite 5, Zeile 9 Seite 5, Zeile 20 -Seite 5, Zeile 33 Abbildungen 1,2</p>	1,4,9,12
A	<p>WO 99 09042 A (CEPHEID) 25. Februar 1999 (1999-02-25) Seite 6, Zeile 30 -Seite 7, Zeile 19 Seite 9, Zeile 34 -Seite 9, Zeile 37 Seite 20, Zeile 8 -Seite 21, Zeile 9 Seite 24, Zeile 21 -Seite 25, Zeile 13 Seite 26, Zeile 11 -Seite 27, Zeile 31 Seite 29, Zeile 23 -Seite 30, Zeile 15 Seite 41, Zeile 21 -Seite 42, Zeile 17 Seite 43, Zeile 23 -Seite 44, Zeile 11 Abbildungen 1-13</p>	1,3-7
A	<p>US 5 856 174 A (FODOR STEPHEN P A ET AL) 5. Januar 1999 (1999-01-05) Spalte 2, Zeile 20 -Spalte 2, Zeile 34 Spalte 2, Zeile 48 -Spalte 2, Zeile 57 Spalte 3, Absätze 1,2 Spalte 10, Zeile 53 -Spalte 11, Zeile 64 Spalte 15, Zeile 9 -Spalte 15, Zeile 48 Spalte 16, Zeile 43 -Spalte 17, Zeile 16 Spalte 17, Zeile 66 -Spalte 18, Zeile 4 Spalte 18, Zeile 26 -Spalte 18, Zeile 62 Spalte 19, Zeile 16 -Spalte 19, Zeile 29 Spalte 19, Zeile 59 -Spalte 20, Zeile 14 Spalte 21, Zeile 26 -Spalte 21, Zeile 41 Spalte 23, Zeile 38 -Spalte 24, Zeile 10 Spalte 24, Zeile 53 -Spalte 25, Zeile 6 Spalte 25, Zeile 42 -Spalte 26, Zeile 15 Abbildungen 1-7</p>	1,3,9,12
P,A	<p>DE 199 40 750 A (FEBIT FERRARIUS BIOTECHNOLOGY) 21. Juni 2000 (2000-06-21) Spalte 2, Zeile 50 -Spalte 2, Zeile 59 Spalte 3, Zeile 61 -Spalte 4, Zeile 22 Spalte 4, Zeile 33 -Spalte 5, Zeile 17 Spalte 6, Zeile 24 -Spalte 6, Zeile 39 Spalte 13, Zeile 21 -Spalte 13, Zeile Spalte 16, Zeile 52 -Spalte 17, Zeile Spalte 18, Zeile 12 -Spalte 18, Zeile Abbildungen 1-3</p>	1,6,7
	<p>---</p> <p>-/--</p>	

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Interne Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
P,A	<p>DE 199 50 225 A (LEICA MICROSYSTEMS HEIDELBERG) 18. Mai 2000 (2000-05-18) Spalte 1, Zeile 3 -Spalte 1, Zeile 19 Spalte 3, Zeile 18 -Spalte 3, Zeile 50 Spalte 3, Zeile 61 -Spalte 4, Zeile 35 Spalte 5, Zeile 68 -Spalte 6, Zeile 13 Abbildungen 2,9,10 -----</p>	1,6

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internat. les Aktenzeichen

PCT/EP 00/06103

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9533846 A	14-12-1995	AU 2943695 A EP 0695941 A EP 0764214 A JP 8166387 A JP 10505410 T US 5945334 A	04-01-1996 07-02-1996 26-03-1997 25-06-1996 26-05-1998 31-08-1999
EP 0840113 A	06-05-1998	JP 10132783 A US 6042708 A	22-05-1998 28-03-2000
WO 9909042 A	25-02-1999	AU 8906698 A EP 1003759 A AU 1947299 A EP 1042061 A WO 9933559 A	08-03-1999 31-05-2000 19-07-1999 11-10-2000 08-07-1999
US 5856174 A	05-01-1999	AU 6404996 A EP 0843734 A JP 11509094 T WO 9702357 A US 6043080 A US 5922591 A	05-02-1997 27-05-1998 17-08-1999 23-01-1997 28-03-2000 13-07-1999
DE 19940750 A	21-06-2000	AU 5625399 A AU 5742499 A AU 5971399 A DE 19940749 A DE 19940751 A DE 19940752 A DE 19940810 A WO 0012123 A WO 0013017 A WO 0013018 A WO 0049142 A	21-03-2000 21-03-2000 21-03-2000 18-05-2000 02-03-2000 27-04-2000 11-05-2000 09-03-2000 09-03-2000 09-03-2000 24-08-2000
DE 19950225 A	18-05-2000	WO 0025171 A	04-05-2000